

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Jitka Poplová

**Hematologické metody v zoologii**

Application of Haematological Methods in Zoological Studies

Bakalářská práce

Školitel RNDr. Michal Vinkler

Konzultant doc. Mgr. Tomáš Albrecht Ph.D.

Praha 2011

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 8. 2011

Jitka Poplová

## **Abstrakt**

Hematologické metody jsou rozšířenou součástí zoologického výzkumu. Bohužel, mnohé, především ekologicky zaměřené studie, trpí určitými metodologickými nedostatky a nepřesnou interpretací výsledků. To se týká především metod vyšetření buněčných krevních elementů. V této práci jsem se proto rozhodla shrnout základní hematologické metody použitelné v zoologické praxi, popsat jejich postupy, výhody i možná úskalí. Zároveň jsem se pokusila upozornit na možnosti aplikace některých méně rozšířených hematologických metod s potenciálně významnou interpretační hodnotou. V praktické části práce jsem ukázala, že vyšetření diferenciálního počtu imaturních erytrocytů může u ptáků sloužit jako pomocný znak indikující zdravotní stav jedince.

**Klíčová slova:** hematologie, erytrocyty, leukocyty, trombocyty, hematokrit, hematopoéza, kondice, ornamentace, parazit

## **Abstract**

Haematological methods are widely used in zoological researches. Unfortunately, especially in ecological studies there is often much imperfection in techniques adopted, and misinterpretation of results is also common. This is particularly the case of methods serving to assessment of the peripheral blood cellular composition. In this thesis I therefore decided to describe basic haematological methods, their mechanisms, advantages and disadvantages. I also highlighted possible application potential in several less widely utilised haematological techniques. In the practical part of this thesis I have shown that the examination of immature erythrocyte differential count may serve as a meaningful indicator of health state in birds.

**Key words:** haematology, erythrocyte, leukocyte, trombocyte, haematocrit, haematopoiesis, condition, ornamentation, parasite

## Obsah

I Úvod.....	5
II Buněčná složka krve.....	6
II.1 Erytrocyty .....	6
II.2 Leukocyty .....	8
Lymfocyty.....	9
Monocyty.....	9
Neutrofily a heterofily .....	10
Eozinofily.....	10
Bazofily.....	11
II.3 Trombocyty.....	11
III Hematologické metody a jejich využití.....	13
III.1 Hematokrit.....	13
Hematokrit a vliv pohlavních hormonů.....	13
Hematokrit a fyzická aktivita.....	14
Hematokrit a stres.....	16
Hematokrit a rychlost krvetvorby.....	17
III.2 MCV.....	18
III.3 Koncentrace hemoglobinu.....	18
III.4 Absolutní počet erytrocytů, trombocytů a leukocytů.....	19
Absolutní počet erytrocytů.....	20
Absolutní počet trombocytů.....	20
Absolutní počet leukocytů.....	20
III.5 Diferenciální počet leukocytů.....	23
IV Vlastní práce.....	29
IV.1 Úvod.....	29
IV.2 Metodika.....	29
IV.3 Výsledky a diskuse.....	30
IV.4 Závěr.....	32
V Závěr.....	33
VI Poděkování.....	34
VII Literatura.....	35

## I Úvod

Hematologie je oborem biologických věd, který se zabývá studiem krve a krvetvorby (Lawrence 2008). Krev se skládá ze dvou základních složek, krevních elementů (červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky/trombocyty) a krevní plazmy (voda nesoucí solubilní látky). Prostřednictvím krve probíhá výměna dýchacích plynů mezi vnějším prostředím a tkáněmi, krev se podílí na udržení stálého vnitřního prostředí organismu, krví jsou transportovány hormony, živiny (cukry, tuky, bílkoviny, vitamíny, minerály), imunologicky významné látky (cytokiny, chemokiny) i buňky imunitního systému, leukocyty. Krev představuje nenahraditelné medium snad pro všechny fyziologické procesy obratlovců a stala se tak předmětem zájmu mnoha zoologických studií.

V této práci není věnována hlavní pozornost popisným studiím, které se zabývají rozměry, počtem a morfologickou strukturou krevních elementů u různých druhů obratlovců. Stanovení těchto hodnot není metodologicky obtížné, avšak zjištěné hodnoty jsou obvykle jen velmi těžko zobecnitelné. Krev a její složky představují totiž vysoce variabilní systém, který je ovlivňován fyziologickým stavem každého jedince, pohlavím, věkem a nesčitelným množstvím environmentálních faktorů, takže se zjištěné hodnoty mohou lišit nejen na mezidruhové úrovni, ale i mezi různými populacemi téhož druhu či dokonce jedinci jedné populace. Přesto jsou tyto popisné studie nesmírně důležité, neboť představují výchozí body pro další výzkum. Ten se pak zaměřuje na hledání odpovědí na konkrétní otázky týkající se vztahu mezi krevními elementy a zdravotním stavem zvířete. Právě tyto studie a otázky, které je možné zodpovědět pomocí hematologických metod, zde budou diskutovány. Ačkoliv hraje krev velkou roli i v imunologické obranyschopnosti organismu, vzhledem k rozsahu, který má tato práce zaujímat, nebylo možné se v ní věnovat podrobně všem aspektům této důležité funkce. To se týká zejména popisu krevní plazmy a metod jejího vyšetření, které tedy nebyly do práce zahrnuty.

## II Buněčná složka krve

### II.1 Erytrocyty

Nejpočetnější buňky v krevním oběhu obratlovců jsou erytrocyty, červené krvinky (Glomski & Tamburlin 1989). U většiny obratlovců se jedná o středně velké buňky, jejichž cytoplasma po obarvení podle Romanowského nabývá charakteristické narůžovělé či světle okrové barvy. Oválné silně kondenzované jádro se pak barví do temně fialova (Campbell & Ellis 2007). Výjimku představují erytrocyty savců, které jádro nemají. Obratlovci nejsou jediní zástupci živočišné říše, v jejichž krvi se tyto buňky vyskytují. Erytrocyty lze v menším množství nalézt i u některých druhů bezobratlých živočichů (např. *Pista pacifica*, *Urechis caupo*, *Noetia ponderosa*, *Phoronis australis*, *Lineus fuscoviridis*, *Cucumaria miniata* a další) (Glomski & Tamburlin 1990). Ačkoliv mají erytrocyty obratlovců i bezobratlých shodné základní znaky, podle známých fylogenetických vztahů se předpokládá, že k jejich vývoji došlo v evoluci vícekrát nezávisle a jedná se tedy o konvergentní struktury (Glomski & Tamburlin 1990). Přes velkou variabilitu ve velikosti, tvaru a intracelulární struktuře erytrocytů napříč všemi obratlovčími taxony zůstává jejich hlavní funkcí přenos dýchacích plynů (kyslíku a oxidu uhličitého) (Hartman & Lessler 1964). K této funkci jsou erytrocyty přizpůsobeny vysokým obsahem kyslík vázajícího proteinu, hemoglobinu (Glomski & Tamburlin 1989). Velikost povrchu erytrocytu je jedním z rozhodujících faktorů pro množství plynu, které mohou tyto buňky přenést. Buňky eliptického tvaru mají větší povrch než sférické buňky o stejném objemu. Eliptické buňky mají tedy větší vazebnou kapacitu a umožňují efektivnější přenos plynu (Hartman & Lessler 1964). Tomuto pravidlu odpovídají i bezjaderné bikonkávní erytrocyty savců, kterým jejich tvar umožňuje nejen efektivní výměnu plynů, ale i vyšší plasticitu při průchodu krevními kapilárami (Campbell & Ellis 2007). Především díky nepřítomnosti jádra patří savčí erytrocyty mezi nejmenší v obratlovčí říši (Hartman & Lessler 1964). Naopak největší erytrocyty nacházíme u obojživelníků (Glomski et al. 1997). Absolutní rekord nese úhořík tříprstý (*Amphiuma tridactylum*), jehož červené krvinky dosahují v důsledku mnohočetné polyploidizace rozměrů 70x40 μm (Claver & Quaglia 2009). Společným znakem jaderných erytrocytů je transkripčně inaktivní jádro obsahující vysoce kondenzovaný chromatin a homogenní hemoglobinem zahuštěná cytoplazma (Campbell & Ellis 2007; Glomski et al. 1992; Glomski et al. 1997). Erytrocyty jednotlivých tříd obratlovců se dále liší především svým celkovým počtem v daném organismu a dobou života v krevním oběhu. Doba života erytrocytů může souviset s rychlostí metabolismu a způsobu života. Jedny z nejdéle fungujících erytrocytů (až 1400 dnů) se nacházejí v periferní krvi obojživelníků (Campbell & Ellis 2007) a plazů (Altland & Brace 1962), což může být způsobeno pomalým metabolismem a obdobím hibernace, kterým většina zástupců těchto skupin obratlovců prochází (Campbell & Ellis 2007). Naopak krátká životnost ptačích erytrocytů (28-48 dnů) (Campbell & Ellis 2007) je pravděpodobně dána rychlým metabolismem a fyzickou náročností letu, který klade zvýšené nároky na dostatečné zásobování tkání

kyslíkem. Rychlejší metabolismus souvisí s vyšším počtem erytrocytů nejen u ptáků (Bearhop et al. 1999), ale například i u ryb (Claver & Quaglia 2009).

Během vývoje erytrocytů je možné u všech obratlovců na základě metody barvení podle Romanowského detekovat šest vývojových stadií červených krevních buněk: rubriblast (proerythroblast), prorubricyt (bazofilní erythroblast), bazofilní rubricyt (časný polychromatický erythroblast), časný polychromatický rubricyt (pozdní polychromatický erythroblast), pozdní polychromatický rubricyt (ortochromatický erythroblast), polychromatický erytrocyt a dospělý erytrocyt (Lucas & Jamroz 1961). První stadium vývoje červených krvinek představují rubiblasty, velké kulaté bazofilní buňky s velkým kulatým jádrem (Campbell & Ellis 2007). V průběhu ontogeneze jaderných erytrocytů dochází k postupné kondenzaci jádra, homogenizaci cytoplazmy a zvýšené produkci hemoglobinu. U savců dochází k úplné ztrátě jádra. U všech obratlovců je možné v periferní krvi zachytit stadium retikulocytů, které představují poslední stádium před dokončením vývoje erytrocytů. Retikulocyty mají typický kruh kolem jádra, který je tvořen retikulocytickým materiálem. Díky tomuto kruhu je možné tyto buňky identifikovat. Použitím vitálního barvení dojde totiž ke zvýraznění retikulárních částic. Během dozrávání buňky se ale tento materiál rozptyluje v cytoplazmě a přestává být detekovatelný (Campbell & Ellis 2007). Přítomnost ostatních vývojových stadií erytrocytů v periferní krvi se u jednotlivých skupin obratlovců liší. U ryb a paryb můžeme v periferní krvi nalézt všechna vývojová stadia včetně mitotických figur (Glomski et al. 1992). U ptáků, plazů a většiny obojživelníků se v periferní krvi nacházejí až polychromatické erytrocyty uvolňované do krevního oběhu z krvetvorných orgánů (kostní dřeň, slezina, játra). Tyto imaturní erytrocyty se od dospělých liší především méně kondenzovaným polychromatickým jádrem, lehce bazofilní cytoplazmou, kulatějším tvarem a často větší velikostí. Také poměrné zastoupení imaturních erytrocytů v krvi se u jednotlivých druhů ptáků, plazů a obojživelníků liší (Campbell & Ellis 2007). Větší počet imaturních stadií erytrocytů ptáků a plazů se může vyskytovat u zvířat trpících anemií, při které dochází k rychlejšímu odbourávání krevních elementů a do krve jsou tak uvolňována nedospělá stadia, která mohou tvořit až okolo 10 % z celkového počtu erytrocytů (Claver & Quaglia 2009; Campbell & Ellis 2007). Příčinou anemie může být ztráta krve vlivem zranění (Campbell & Ellis 2007), krevních nebo krev sajících parazitů (Varma & Naseem 2010), poruchy srážlivosti krve způsobené toxickými látkami (Yamoto et al. 1996), poruchy jater či virové infekce (Rauff et al. 2011). Tento mechanismus uvolnění velkého počtu imaturních erytrocytů z hematopoetické tkáně do periferní krve umožňuje ptákům a plazům lépe snášet krevní ztráty než například savcům, u kterých se v krvi běžně nacházejí pouze dospělé bezjaderné erytrocyty (Campbell & Ellis 2007). Zvýšená hladina imaturních erytrocytů je také typická pro mláďata (Campbell & Ellis 2007; Vinkler et al. 2010b); u plazů a ptáků tvoří až 38 % všech erytrocytů v periferní krvi (Vinkler et al. 2010b). V krvi savců se jaderné imaturní erytrocyty vyskytují jen během prvních 5 dnů života. Jejich zvýšenou koncentraci

může způsobit například předčasný porod nebo nedostatečné zásobení plodu kyslíkem (Constantino & Cogionis 2000). Prekurzory savčích erytrocytů jsou jaderné buňky, jejichž flexibilita membrány se zvyšuje s vývojovým stupněm, ve kterém se buňka nachází. Na rozdíl od dospělých erytrocytů nemají tyto buňky ještě schopnost deformace danou extrémní flexibilitou membrán a homogenitou přítomného hemoglobinu, což zabraňuje jejich průchodu malými kapilárami z hematopoetické kostní dřeně do krevního řečiště (Leblond et al. 1971). Přítomnost jaderných erytrocytů v periferní krvi savců je tak ukazatelem poruchy ve struktuře kostní dřeně, která může být způsobena například nádorovým onemocněním (Sills & Hadley 1983). Bezjaderné erytrocyty se ovšem vyskytují i mimo vývojovou větev savců. Například u většiny ptáků tvoří minoritní složku mezi krevními erytrocyty a nazývají se erytroplastidy (Campbell & Ellis 2007). U ryb je výskyt erytroplastidů příznakem specifických typů anemie. U mločika kalifornského (*Batrachoseps attenuatus*) se však takovéto bezjaderné erytrocyty vyskytují v krvi zdravých zvířat a to s frekvencí až 90-95% (Campbell & Ellis 2007; Glomski et al. 1997). Malé bezjaderné erytrocyty má také drobná rybka stříbrník Müllerův (*Maurolicus muelleri*; Claver & Quaglia 2009) a u antarktické ryby *Chaenocephalus aceratus* je krev bezbarvá a neobsahuje erytrocyty ani hemoglobin. Nízká teplota vody zvyšuje rozpustnost plynů a umožňuje této poměrně velké rybě dýchání povrchem těla (Glomski & Tamburlin 1989).

Bylo zjištěno, že erytrocyty ryb a ptáků mají i další důležitou funkci než jen přenos dýchacích plynů. Na svůj povrch mohou totiž nespecificky vázat některé patogenní organismy. Spolu s monocyty a makrofágy jsou schopny vytvářet uskupení okolo patogenních organismů tzv. rozety, kde díky těsnému kontaktu erytrocytů s makrofágy a monocyty dochází ke zvyšování fagocytické aktivity. (Passantino et al. 2007; Passantino et al. 2002).

## II.2 Leukocyty

Leukocyty neboli bílé krvinky patří mezi imunologicky významné krevní elementy obratlovců. Do periferní krve jsou dospělá stadia leukocytů uvolňována z kostní dřeně, kde vznikají z pluripotentních hematopoetických kmenových buněk, konkrétně z myeloidního prekurzoru v případě eozinofilů, bazofilů, neutrofilů / heterofilů a monocytů nebo z lymfoidního prekurzoru v případě T a B lymfocytů a NK buněk. Tyto vývojové větve leukocytů se morfologicky odlišují. Buňky myeloidní linie s výjimkou monocytů obsahují polymorfní jádro a v cytoplazmě barvitelná granula, proto bývají označovány jako granulocyty či polymorfonukleární buňky. Buňky vznikající z lymfoidní linie mají jádro nesegmentované a až na výjimky neobsahují specifická granula a bývají tedy společně s monocyty označovány jako agranulocyty (Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961).



### *Lymfocyty*

Lymfocyty obratlovců jsou si vzájemně velmi podobné a výrazně větší velikostí vynikají jen lymfocyty obojživelníků. Obecně mají lymfocyty velké kulaté ve středu nebo lehce acentricky umístěné jádro zaujímající velkou část buňky. Jaderný chromatin má často výraznou mřížkovitou strukturu. Po diferenciálním barvení světle namodralá cytoplazma neobsahuje ve většině případů vakuoly ani granula a představuje díky obrovskému jádru jen malou část buňky. Barva cytoplazmy je důležitým charakteristickým znakem při identifikaci malých lymfocytů, které je možné zaměnit s trombocyty. Velké lymfocyty nacházející se v krvi ptáků a savců jsou často zaměňovány za monocyty kvůli své velikosti, většímu množství cytoplazmy a poměrně světlé barvitelnému jádru (Campbell & Ellis 2007; Gao et al. 2007; Lucas & Jamroz 1961). Podle Campbella a Ellise (2007) je možné v případě infekce v krvi identifikovat tzv. reaktivní lymfocyty, které se vyvíjí z lymfocytů po stimulaci antigenem a mají výrazně strukturované jádro a tmavší cytoplazmu. Zde je však potřeba upozornit, že kategorizace lymfocytů v hematologických studiích patrně příliš neodpovídá imunologické funkci těchto buněk. Světelná mikroskopie neumožňuje například ani základní rozlišení T a B buněk, natož jejich jakoukoliv jemnější funkční specifikaci. K detailnějšímu rozlišení lymfocytů je tedy potřeba využít některé imunologické detekční metody, například barvení specifickými protilátkami.

### *Monocyty*

Monocyty patří mezi největší leukocyty a velikostí jim mohou konkurovat jen velké lymfocyty. Od lymfocytů se však liší světlejším jádrem, které může být kulovité až laločnaté a obsahuje méně shlukovitý chromatin. Cytoplazma je modrošedá. Vzhledem k fagocytické aktivitě monocytů mohou být přítomny i vakuoly a fagocytovaný materiál. Monocyty mají schopnost migrovat do tkání, kde se z nich stávají makrofágy. Svou produkcí aktivních látek napomáhají navození zánětu a usmrcení cizorodých organismů (Campbell & Ellis 2007).

U plazů tvoří významnou skupinu tzv. azurofily. Jedná se o monocyty obsahující azurofilní granula, která se v malém množství vyskytují i u ptáků a savců. Přítomnost těchto granulí způsobila, že někteří autoři řadili azurofily mezi granulocyty, ale cytochemické studie ukázaly, že tyto buňky patří mezi monocyty (Campbell & Ellis 2007). Od klasických monocytů se azurofily liší nejen přítomností granulí, ale i nesegmentovaným nepravidelně kulovitým nebo oválným jádrem a tmavší cytoplazmou.

### *Neutrofily a heterofily*

Neutrofily savců jsou funkčními ekvivalenty heterofilů u ptáků, plazů, ryb a obojživelníků. Neutrofily jsou nejpočetnější leukocyty v periferní krvi savců, na rozdíl od heterofilů ptáků, které jsou obvykle až druhé nejpočetnější po lymfocytech. Jinak jsou si neutrofily a heterofily svou strukturou a funkcí natolik podobné, že si mohu dovolit v dalším popisu používat jen označení heterofily. Charakteristickým znakem heterofilů jsou kyselá cytoplazmatická granula elipsovitého či vřetenovitého tvaru. Pomocí barvení podle Romanowského je možné tato granula obarvit, přičemž získají cihlově červenou barvu a patří tak mezi důležité identifikační znaky heterofilů od ostatních granulocytů. Cytoplazma těchto buněk je bezbarvá nebo lehce narůžovělá. Jádra dospělých heterofilů mají 2-3 laloky a barví se více bazofilně než jádra eozinofilů (Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961; Maxwell & Robertson 1998). Čím jsou heterofily starší, tím více laloků jejich jádra obsahují (i pět a více). Průměrný počet laloků jader granulocytů udává tzv. Arnethův index. Nízké hodnoty Arnethova indexu indikují v těle probíhající zánět, při němž dochází k rychlé migraci granulocytů do postižené tkáně, čímž v krvi zůstávají pouze mladé buňky. Naopak vysoký Arnethův index může naznačovat deficit kyseliny listové, vitamínu B12 nebo špatnou činnost jater, kdy v krvi cirkulují přestárlé buňky (Lucas & Jamroz 1961). Fagocyticky aktivní heterofily jsou jedny z prvních složek imunitního systému, které se podílejí na reakci proti infekci, zánětu či působícímu stresu. Jejich počet závisí na fyziologickém stavu jedince a je druhově specifický (Davis et al. 2008).

### *Eozinofily*

Rovněž eozinofily patří mezi granulocyty. V krvi obratlovců se obvykle vyskytují s relativně menší frekvencí (1-3 %) než heterofily/neutrofily (Campbell & Ellis 2007). Není tomu tak však například u obojživelníků, u kterých tvoří eozinofily průměrně okolo 32 % z celkového počtu bílých krvinek, jak upozorňují ve své studii Davis a Durso (2009). Od heterofilů se eozinofily liší po obarvení podle Romanowského tmavším jádrem, namodralou cytoplazmou, která však není často téměř viditelná kvůli velkému počtu bezbarvých či narůžovělých cytoplazmatických granul. Jádro v typickém případě zaujímá tvar písmene U a obsahuje nejčastěji jeden až dva laloky (Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961; Maxwell 1987). K identifikaci stáří buněk může být použit stejně jako u heterofilů Arnethův index (Lucas & Jamroz 1961). Cytoplazmatická granula jsou obvykle ve srovnání s heterofily větší a kulatější, ačkoliv u některých druhů mohou být i elipsovitě protáhlá. Tato granula obsahují vysokou koncentraci enzymů jako je peroxidáza, kyselá fosfatázy a arylsulfatázy. Přítomnost peroxidáz je dalším znakem, kterým se eozinofily liší od heterofilů. Tyto enzymy jsou eozinofily využívány při jejich fagocytické aktivitě, která však není natolik efektivní jako je tomu u heterofilů. Zvýšené procento eozinofilů v krvi je možné zaznamenat v případě parazitární infekce, především larvami helmintů nebo při alergické reakci spojené s degranulací bazofilů (Campbell & Ellis 2007;

Maxwell 1987). Ačkoliv byly eozinofily popsány již před 165 lety (viz (Maxwell 1987), zůstává jejich funkce v těle obratlovců z velké části nejasná.

### *Bazofily*

Bazofily patří mezi největší granulocyty. Mají nelaločnaté centricky umístěné jádro, které může být ve výjimečných případech rozděleno na dva laloky. Tomu odpovídá Arnethův index 1,01 (Lucas & Jamroz 1961). Jaderný chromatin je jen lehce kondenzovaný a často je přítomno jedno až dvě jadérka. Po barvení podle Romanowského zůstává cytoplazma bezbarvá a její velkou část zaujímají tmavě purpurově se barvící bazofilní granula. Tato granula jsou extrémně solubilní a dojde k jejich okamžitému zničení, pokud přijdou během barvení do kontaktu s vodou. Kontrastnějšího obarvení bazofilů je dosaženo, pokud při první fázi fixace krevního nátěru není použit metanol (Robertson & Maxwell 1990). Chemické složení cytoplazmatických granulí je specifické pro jednotlivé třídy obratlovců, například ptačí bazofily neobsahují na rozdíl od savčích bazofilů žádnou peroxidázu, ale obsahují kyselé fosfatázy (Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961; Maxwell & Robertson 1995). Mnoho dřívějších studií (z počátku 20. století) zaměňovalo bazofily za mastocyty, žírné buňky, které jsou tkáňovým ekvivalentem bazofilů, kvůli jejich podobným morfologickým znakům a barvitelnosti. Oba typy těchto buněk mají i další společný znak, kterým je degranulace po histaminovém testu (Maxwell & Robertson 1995). Počet bazofilů v periferní krvi je druhově specifický a záleží také na stáří a pohlaví jedince, prostředí, stravě a dalších vnějších faktorech (Ewenson et al. 2001). Obecně jsou bazofily přítomny ve vyšší frekvenci v krvi ptáků než savců. Zatím zřejmě nejvyšší počet bazofilů byl zjištěn u hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*). Bazofily dospělců tohoto druhu tvoří až 65 % z celkového počtu leukocytů v periferní krvi (Vinkler et al. 2010b). Běžně tvoří bazofily spolu s eozinofily pouze okolo 5-15 % z celkového množství leukocytů (Davis 2011). Vyšší počet bazofilů mají také mláďata ptáků, u kterých tvoří bazofily důležitou součást jejich imunologické obrany proti patogenům do doby, než dojde k plnému rozvoji mechanismů závislých na lymfocytech (asi do 3. týdne života). S věkem tedy počet bazofilů v krvi klesá (Maxwell & Robertson 1995). Bazofily následované heterofily a monocyty jsou prvními buňkami, které infiltrují do místa poranění či vznikajícího zánětu. Lze je zde detekovat již 30 min po vzniku zánětu a přetrvávají ve tkáni 24-36 hodin (Maxwell & Robertson 1995; Vinkler et al. 2010a; Martin et al. 2006). Degranulace bazofilů (uvolnění histaminu a další vasoaktivních látek) během zánětlivého procesu způsobí zvýšení permeability cév, což umožní infiltraci dalších leukocytů do místa zánětu (Maxwell & Robertson 1995).

## **II.3 Trombocyty**

Trombocyty, krevní destičky, jsou po erytrocytech druhé nejpočetnější buňky v periferní krvi obratlovců (Lucas & Jamroz 1961). Krevní destičky savců vznikají z megakaryocytů umístěných v

kostní dřeni. K jejich produkci dochází díky přeskupení cytoplazmy a vzniku jakési panožky tvořené extenzivní částí cytoplazmy (tzv. proplatelet), která dosahuje skrze spoje endothelia až do cévy, kde do krevního řečiště uvolňuje fragmenty, krevní destičky (Semple et al. 2011). Krevní destičky savců tedy nemají žádné jádro a jsou velmi drobné, diskovitého tvaru, který je přesně definován specializovaným cytoskeletem. Naopak trombocyty ostatních obratlovců jsou jaderné buňky s nepravidelným okrajem vznikající z myeloidního prekursoru v kostní dřeni (Lucas & Jamroz 1961; Campbell & Ellis 2007). Cytoplasma trombocytů je po obarvení bezbarvá nebo lehce šedá a je důležitým poznávacím znakem pro jejich odlišení od malých lymfocytů. V cytoplazmě se vyskytují specifická granula, jejichž počet, barva, velikost i pozice v buňce je velmi variabilní. (Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961). Savčí krevní destičky i trombocyty ryb, obojživelníků, plazů a ptáků mají stejnou funkci. Pohybují se spolu s ostatními krevními elementy cévním řečištěm a ve chvíli, kdy dospějí k poškozenému místu cévy, prodělají vápníkem řízenou aktivaci. Takto aktivované krevní destičky a trombocyty mění tvar vytvořením prstovitých filopodií a pseudopodií. Tato změna vyvolá jejich okamžité shlukování, degranulaci specifických granulí, produkci tromboplastinu, polymerizaci fibrinogenu a vznik sraženiny, která umožní utěsnit poškození cévy (Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961; Semple et al. 2011). Zároveň aktivované destičky a trombocyty produkují velké množství v krevní plasmě rozpustných látek a povrchových molekul, které vedou k úplnému zastavení krvácení. Mezi tyto molekuly patří také nejrůznější cytosiny a chemokiny, které jsou prozánětlivé, způsobují chemotaktický pohyb leukocytů do místa poškození tkáně a formují tak imunitní odpověď organismu (Semple et al. 2011). Lam (1997) ve své studii ukázal, že trombocyty jsou schopné spustit imunitní odpověď organismu také potom, co rozpoznají virem nakažené buňky a adherují na ně. Další důležitou roli trombocytů v nespecifické imunitní odpovědi prokázali Wiegley et al. (1999). Ve své práci ukázali, že trombocyty jsou schopny fagocytózy a podílejí se tak na odstraňování cizorodého materiálu včetně bakterií z krve.

Vyšetření trombocytů v periferní krvi naráží ovšem vzhledem k funkci těchto buněk na určité obtíže. Vzhledem k tomu, že po porušení krevní cévy dochází k okamžité aktivaci trombocytů a následné změně jejich poměru v krvi, je nezbytné pro vyšetření použít, pokud možno, kapku krve odebranou jako první. Lam (1997) ve své studii poukazuje na to, že jakmile trombocyty opustí tělo ptáka, tak do tří hodin spustí programovanou buněčnou smrt a umírají i při použití antikoagulačních látek. Je však možné, že tento výsledek byl způsoben použitím antikoagulačního činidla heparinu, který, jak upozorňuje Campbell a Ellis (2007), není vhodné používat pro práci s krví ptáků. Normální životnost ptačích trombocytů je až 5 měsíců, na rozdíl například od životnosti bezjaderných krevních destiček člověka, které se v periferní krvi pohybují pouze kolem 8-9 dnů (Semple et al. 2011).

### III Hematologické metody a jejich využití

#### III.1 Hematokrit

Nejčastější a snad nejrutinněji prováděnou hematologickou metodou používanou u obratlovců je měření hematokritu (v angličtině též packed cell volume; PCV). Jde o procentuální stanovení objemu erytrocytů v jednotce krve. Měření spočívá v odběru krve do kapiláry, která je uvnitř potažena antikoagulačním činidlem, například heparinem sodným. Po utěsnění jednoho konce kapiláry následuje centrifugace, zpravidla při 10 000-12 000g po dobu 5 minut. Po odstředění lze v kapiláře rozlišit tři zóny. Svrchní vrstvu tvoří plazma, spodní vrstvu erytrocyty a mezi nimi je možné rozeznat slabý bělavý proužek tzv. buffy coat, tj. vrstvu složenou z leukocytů a trombocytů (Campbell & Ellis 2007; Fair et al. 2007a; Lucas & Jamroz 1961). Hematokrit je vyjádřen jako poměr sedimentu erytrocytů k celkové výšce krevního sloupce. Bylo zjištěno, že souvisí s celou řadou znaků a fyziologických pochodů. Nízká hladina hematokritu (anémie) může být například ukazatelem bakteriální infekce, přítomnosti krevních či krev sajících parazitů (Dawson & Bortolotti 1997; Carleton 2008), dehydratace, působení toxinů (Yamato et al. 1996), nedostatečného příjmu minerálních prvků potravou (Moreno et al. 1998), podvýživy (Munoz et al. 2010) nebo přímé ztráty krve například následkem zranění (Campbell & Ellis 2007). Interpretace hodnot hematokritu však právě pro velké množství těchto vztahů obvykle není zcela jednoznačná. Níže budou zmíněny hlavní faktory asociované s hodnotami hematokritu a na vybraných příkladech bude nastíněna možná fyziologická interpretace jednotlivých vztahů. Jak bude ukázáno, ačkoliv existují práce, které se snaží stanovit hodnoty hematokritu charakteristické pro zdravé jedince různých druhů (viz např. Gillespie et al. 2000; Tociłowski et al. 1997; Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961), tyto hodnoty se mohou bez ohledu na zdravotní stav významně lišit vzhledem k ekologickým podmínkám, a to jak mezi různými populacemi stejného druhu, tak i v rámci jedné populace mezi jedinci opačného pohlaví a v závislosti na sezónních změnách.

#### *Hematokrit a vliv pohlavních hormonů*

Jak již bylo naznačeno, samci a samice se mohou v hodnotách hematokritu lišit (Kavadias et al. 2004; Kilpimaa et al. 2004). Intuitivním vysvětlením pro tyto rozdíly mohou být mezipohlavní rozdíly v koncentraci pohlavních hormonů. Například u lejska černošedého (*Ficedula hypoleuca*) Kilpimaa et al. (2004) ukázali, že experimentálně zvýšené úsilí o nalezení partnerky vyvolává u samců jednak zvýšenou expresi sekundárního pohlavního znaku v podobě světlé skvrny u kořene zobáku a zároveň s tím také nárůst hodnot hematokritu. Tyto výsledky by tedy mohly naznačovat souvislost hematokritu se zvýšenou hladinou testosteronu podporující tvorbu ornamentace (Kilpimaa et al. 2004). Podobně bylo zjištěno u ryby mořčáka evropského (*Dicentrarchus labrax*), že změny hematokritu souvisí s pohlavním dospíváním (Kavadias et al. 2004). Někteří autoři proto předpokládají, že samčí pohlavní hormony



stimulují erytropoézu a naopak samičí estrogeny erytropoézu inhibují (Sturkie 1986). Takovýto vliv androgenů na erytropoézu podporují například výsledky studie prováděné na kuru domácím *Gallus gallus f. domestica*. Kastrovaní kohouti plemene bílá leghornka, postrádající endogenní řízení androgeny, měli nižší hladinu hematokritu než nekastrování jedinci (Chen et al. 2009). Proti existenci podobné hormonální závislosti ovšem hovoří velká většina studií, které žádné rozdíly mezi hodnotami hematokritu u samců a samic nenalezly (Fair et al. 2007b; Dawson & Bortolotti 1997; Fernie & Bird 2001; Phalen et al. 1995). To podporuje i výsledek pokusu provedeného na samicích špačka obecného (*Sturnus vulgaris*; De Ridder et al. 2002). Po implantaci testosteronu do těla pokusných samic nedošlo ve srovnání s kontrolními samicemi, kterým testosteron implantován nebyl, ke změně hematokritu. Jiné znaky však zásahem ovlivněny byly: vlivem testosteronu došlo u samic například ke změnám zpěvové a behaviorální aktivity, zbarvení zobáku i načasování pelichání.

Hormonální regulace takovýchto změn v hodnotách hematokritu by ve skutečnosti mohla souviset s fyziologickými mechanismy udržujícími obsah vody v těle. Například Morton (Morton 1994) zaznamenal u strnadců bělokorunkatých (*Zonotrichia leucophrys*) vyšší hodnoty hematokritu u samců před začátkem rodičovské péče. Upozorňuje však na to, že estrogen v tomto případě nemůže u samic plnit funkci inhibitoru erytropoézy. V době jarní migrace totiž stoupá hladina estrogenů v tělech samic připravujících se na hnízdění a tato zvýšená hladina přetrvává nejméně do doby snesení prvního vejce. Ve stejné době ovšem u obou pohlaví také dochází ke zvýšení hematokritu, patrně jako odpověď na fyzickou náročnost migrace (Morton 1994; Saino et al. 1997b). Rozdíl mezi pohlavími v hodnotách hematokritu vzniká až později, v průběhu hnízdění, kdy u samic hodnoty hematokritu výrazně klesají přibližně v období před snesením prvního vejce (Morton 1994). Morton (Morton 1994) vysvětluje tento jev jako nespecifický důsledek zvýšené hladiny neurohypofyzárního hormonu vasotocinu, který má u ptáků antidiuretické vlastnosti a spolu s mesotocinem stimuluje motilitu dělohy při kladení vajec (Sturkie 1986). Jeho antidiuretické vlastnosti způsobují zadržování tekutin v těle samice, což vede ke zvětšení objemu plazmy a naředění krevních buněčných elementů. To se pak projeví poklesem hematokritu.

### *Hematokrit a fyzická aktivita*

Mezipohlavní rozdíly v hodnotách hematokritu zjištěné u některých druhů by mohly souviset s rozdílnou ekologií obou pohlaví. Vzhledem k funkci erytrocytů by se mohlo jednat o rozdíly ve fyzické aktivitě související s odlišnými oxidačními nároky organismu. Takovýto vztah naznačují výsledky výzkumu prováděného na vlaštovce obecné (*Hirundo rustica*). Samci tohoto druhu mají ve většině případů vyšší hladinu hematokritu než samice. Zároveň však samci vlaštovek exprimují delší ocasní pera než samice. Vztah mezi pohlavím a hodnotami hematokritu by tedy mohl být alometrický, spojený s energetickými letovými nároky. Ve své práci Saino et al. (1997b) ukázali, že porovnáváme-li samce

a samice se stejnou délkou ocasu, pak jsou hodnoty hematokritu u obou pohlaví srovnatelné. Zdá se tedy, že delší rýdovací pera představují pro vlaštovky fyzickou zátěž, která vyvolává vyšší nároky na množství kyslíku přiváděného do tkání. Vyšší spotřeba kyslíku vede ke zvýšení počtu červených krvinek, a tím i hladiny hematokritu. Vyšší hladina hematokritu u jedinců s delším ocasem je tedy adaptivní odpovědí organismu na nedostatečné zásobení tkání kyslíkem, a ne důsledkem hormonální regulace. Pokud by však v této studii nebyla měřena délka ocasu a její souvislost s hladinou hematokritu nebyla testována, bylo by možné vysvětlovat vyšší hematokrit u samců mylně jako důsledek vyšší hladiny androgenů. K podobným výsledkům jako Saino et al. (1997b) dospěli i jiní autoři. Například Clark et al. (2009) vysvětlují nalezený rozdíl v hladině hematokritu mezi pohlavími u lososů nerka (*Oncorhynchus nerka*) rozdílnou investicí do reprodukce. Dospívající jedinci obou pohlaví těchto ryb mají stejný hematokrit (Sandblom et al. 2009), který se však u samic mění v posledních 2-3 týdnech života při cestě ryb na trdliště. U samic dochází vlivem migrace, která je fyzicky velmi vyčerpávající, ke zvýšení erytropoézy, a tím i zvýšení hematokritu. Je zajímavé, že samci na zvýšenou fyzickou zátěž reagují jinak než samice. Hodnoty hematokritu samců naměřené při vyšetření na trdlišti se nelišily od hodnot získaných před započítím migrace. Místo zvýšené erytropoézy však došlo vlivem fyzické zátěže ke zvýšení tepové aktivity samců (Clark et al. 2009). Vlivem zvýšené fyzické aktivity na hladinu hematokritu v době rozmnožování se zabývala i studie leguánů (*Amblyrhynchus cristatus*). V této práci byli porovnáváni samci s vyvinutým sexuálním ornamentem vykazující teritoriální chování, satelitní samci a nespárovaní samci. Teritoriální samci vykazovali vyšší hladinu hematokritu a vyšší koncentraci stresového hormonu kortikosteronu v krvi. Zároveň však byla u těchto samců naměřena nižší imunitní odpověď a celkově horší tělesná kondice než u satelitních a nespárovaných samců (Berger et al. 2005). Vysoká hladina kortikosteroidů v krvi naznačuje, že tito samci utrpěli velké energetické ztráty spojené s reprodukčním úsilím během období rozmnožování (Berger et al. 2005). V období hájení teritoria totiž teritoriální samci leguánů zkracují čas určený ke krmení a hladoví až 12 dní (Trillmich 1983 ex Berger et al. 2005). Podobný pozitivní vztah mezi hodnotami hematokritu a reprodukčním obdobím spojeným s vyšší fyzickou zátěží byl zjištěn i u plotice obecné (*Rutilus rutilus*; Kortet et al. 2003). Zdá se tedy, že by se mohlo jednat o obecný vztah.

Období zvýšené svalové aktivity spojené s nárůstem erytropoézy může představovat také migrace (Morton 1994; Saino et al. 1997a; Clark et al. 2009). U migrujících druhů ptáků bylo zjištěno, že hodnoty hematokritu po přiletu na hnízdiště klesají (Saino et al. 1997b; Morton 1994), patrně v souvislosti s poklesem denní letové aktivity. U samců vlaštovek s uměle prodlouženými ocasními pery ihned po přiletu na hnízdiště však došlo k pomalejšímu poklesu hematokritu než u kontrolních samců a samců, kterým byl ocas zkrácen (Saino et al. 1997a). Tyto výsledky tedy podporují hypotézu, že vyšší hodnoty hematokritu souvisí s vyššími energetickými nároky jedince a vyšší potřebou efektivního zásobování tkání kyslíkem.

*Hematokrit a stres*

Výše zmíněné studie (Clark et al. 2009)) na lososech a (Berger et al. 2005) na leguánech však mohou mít i jiné vysvětlení než přímý vliv zvýšené oxidační zátěže. V obou případech se zvířata s vyššími hodnotami hematokritu nacházela ve stavu vyšší stresové zátěže. Hematokrit by tedy mohl reagovat na hormonální regulaci stresové odpovědi, a to preventivně – tedy jako příprava na vyšší fyzickou zátěž, a to i v případech, kdy tato zátěž nakonec nenastává. To dokládají výsledky mnoha studií, které ukázaly vztah mezi hladinami stresových hormonů a hodnotami hematokritu. Například výsledky (Boonstra et al. 1998)) na zajících měnivých (*Lepus americanus*) dokazují vliv manipulačního stresu na zvýšení hodnot hematokritu. Při odchytu a následné manipulaci se do krevního oběhu uvolňují erytrocyty ze sleziny jako odpověď na náhlé zvýšení hladiny adrenalinu (Cross et al. 1988 ex Boonstra et al. 1998). Podobná závislost byla pozorována také u hraboše pensylvánského (*Microtus pennsylvanicus*; Fletcher & Boonstra 2006). Identické závěry naznačují také výsledky prováděné (Boere et al. 2005) na kosmanu černovousém (*Callithrix penicillata*), dokumentující vyšší hodnoty hematokritu po odchytu u dospělých jedinců trpících vyšší mírou stresu. Dokonce u člověka byl prokázán podobný vliv akutního, avšak mentálního stresu na zvýšení hodnot hematokritu (Van Zanten et al. 2004). Stejně jako v případě kosmana i zde patrně vyšší hodnoty hematokritu souvisejí s redukcí objemu krevní plasmy (Van Zanten et al. 2004). Intenzita stresové zátěže vyvolávající podobné změny hematokritu však bude patrně druhově specifická, neboť obdobné změny nebyly pozorovány po manipulaci ani u sysla Richardsonova (*Spermophilus richardsonii*; Delehanty & Boonstra 2009), ani u žraloka kanadského (*Rhizoprionodon terraenovae*; Hoffmayer & Parsons 2001). U běluhy mořské (*Delphinapterus leucas*) dokonce (St Aubin et al. 2001) popisují pokles hematokritu jako důsledek stresu spojeného s odchycem jedince. U této studie je však třeba podotknout, že pozorovaný vzorek sestával pouze ze dvou jedinců zpětně odchycených v rozdílném časovém období po prvním odchytu.

Induktory stresové reakce ovlivňující změny hematokritu však mohou být různé. To se může projevit také na povaze závislosti mezi stresem a hematokritem. Studie vlivu fotoperiody provedená u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) například ukázala, že nepřirozená fotoperioda 24h světla vyvolává u ryb stresovou reakci spojenou se zvýšením hladiny kortizolu (Leonardi & Klempau 2003). Při této fotoperiodě pak dochází u pokusných pstruhů také k nárůstu hematokritu a počtu červených krvinek oproti kontrolám umístěných v chovech s přirozenou fotoperiodou (Valenzuela et al. 2006a). V krvi experimentálních ryb však bylo větší množství imaturních erytrocytů, což naznačuje, že nedošlo ke stimulaci erytropoézy vlivem světelné expozice, ale naopak jejímu potlačení (Valenzuela et al. 2006b). Zvýšení počtu erytrocytů může být patrně způsobeno uvolněním dospělých i nedospělých erytrocytů ze sleziny jako reakce na akutní stres (Kita & Itazawa 1989). Není tedy překvapivé, že různé formy dlouhodobého stresu mohou u některých druhů způsobit naopak pokles hodnot hematokritu. To



bylo pozorováno například v případě dlouhodobého stresu spojeného s vyšším výskytem predátorů u zajíce měnivého (Boonstra et al. 1998). Nízká hladina hematokritu může být způsobena také stresem v důsledku dlouhodobější podvýživy (Dunlap 1995; Peterson 2002; Lochmiller et al. 1986; Tavares-Dias et al. 2009). Například samice pekari Tayassu tajgu krmené potravou vyšší kvality měly signifikantně vyšší hematokrit a počet červených krvinek než samice krmené málo kvalitní potravou (Lochmiller et al. 1986). Také u amazonské sladkovodní želvy teraky velké *Podocnemis expansa* bylo prokázáno, že podávání nízkenergetické potravy způsobí podvýživu, která vede k poklesu hematokritu a počtu červených krvinek oproti kontrolním želvám krmených běžnou potravou (Tavares-Dias et al. 2009). V těchto případech je ovšem pravděpodobná kombinace vlivu stresu s nutriční deficiencí inhibující erytropoézu a způsobující anemii.

### *Hematokrit a rychlost krvetvorby*

Jak již bylo zmíněno, hodnoty hematokritu mohou odrážet zadržování vody v těle. Podobně však nezbytně odrážejí také rychlost hematopoézy. Jako příklad lze uvést právě studie na anemických zvířatech. Například Yamato et al. (1996) popisuje vyšetření krve mořských ptáků zasažených havárií nákladní lodi spojenou s únikem ropných a olejnatých látek. Krev byla odebírána 12. a 26. den po havárii. Odběry krve 12. den vykazovaly nízkou hladinu hematokritu a nízký počet červených krvinek, nasvědčující anemii. V krvi bylo detekováno velké množství imaturních erytrocytů dokazujících intenzivní erytropoézu, která se projevila i v krevních vzorcích z 26. dne po havárii. Vzorky z 26. dne vykazovaly vyšší hodnoty hematokritu a vyšší absolutní počet erytrocytů. Tato studie tedy dokazuje, že hodnoty hematokritu mohou indikovat probíhající regeneraci krve po akutní anemické příhodě. Podobně studie zabývající se dlouhodobým působením znečištění různého charakteru na organismy naznačují vztah hematokritu k hematopoéze. Například negativní vliv znečištění těžkými kovy na hladinu hematokritu byl prokázán u samic novozélandských bílých králíků (*Oryctolagus cuniculus* f. *domestica*; Bersenyi et al. 2003) a samic laboratorních potkanů (*Rattus norvegicus*; Hiratsuka et al. 1996), kde pokles hematokritu doprovázelo snížení absolutního počtu erytrocytů, vedoucího až k anemii. Ke stejnému výsledku došla i studie zabývající se vlivem ropných látek na norka amerického (*Mustela vison*; Schwartz et al. 2004). Norci byli v této studii využiti jako možná laboratorní náhrada fylogeneticky příbuzných volně žijících mořských vyder (*Enhydra lutris*), jejichž zvýšená mortalita může být způsobena právě konzumací kořisti kontaminované ropnými látkami (Schwartz et al. 2004). Naproti tomu u myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*), u níž byl zjištěn stejný vztah mezi hematokritem a znečištěním těžkými kovy, klesal hematokrit, ačkoliv vlastní počet červených krvinek zůstal nezměněn (Rogival et al. 2006). Tento výsledek se ani autorům této studie nepodařilo vysvětlit.

Hematokrit není závislý jen na množství červených krvinek, ale také na jejich velikosti. Pokud dojde v organismu ke ztrátě krve, sníží se jednak počet erytrocytů na objemovou jednotku krve, ale v reakci na tento stav se následně mohou do krevního oběhu uvolnit ve větším množství imaturní stádia erytrocytů (to platí především pro plazy včetně ptáků). Imaturní erytrocyty jsou objemnější, než normální dospělé erytrocyty. Proto se po rozsáhlejší ztrátě krve u ptáků (a patrně i ostatních obratlovců s jadernými erytrocyty) hodnoty hematokritu nemusí buďto vůbec změnit anebo se mohou dokonce zvýšit (Bearhop et al. 1999).

### III.2 MCV

MCV je zkratka z anglického termínu mean cell volume. Tato zkratka označuje sekundární hematologický parametr, který je možné stanovit z primárně zjištěných hematologických parametrů, jakými jsou hematokrit a počet červených krvinek. Výpočet tohoto sekundárního parametru je v zoologii obratlovců používán pro stanovení anémie (Campbell & Ellis 2007). Hodnotu MCV je možné spočítat jako  $(\text{hematokrit (\%)} / \text{absolutní počet červených krvinek}) \times 10$ . Z čehož je zřejmé, že hodnota MCV je závislá na velikosti buněk a mohla by u ptáků ukazovat na rychlost metabolismu a oxidační nároky. Na mezidruhové úrovni by nižší hodnoty MCV mohly indikovat rychlejší metabolismus, neboť druhy ptáků s vyšším metabolismem mají obecně menší erytrocyty, a tím celkově větší povrch buněk pro přenos dýchacích plynů (Bearhop et al. 1999). Naproti tomu na vnitrodruhové úrovni by rychlejší metabolismus mohly indikovat vyšší hodnoty MCV, jelikož relativně větší objem zaujímají imaturní erytrocyty, jejichž zvýšený podíl v krvi (a tedy i vyšší MCV) je indikátorem rychlejší erytropoézy, která by mohla být asociována s relativně rychlejším metabolismem (viz například Vinkler et al. 2010b). V takovém případě by tedy hodnoty MCV podávaly obdobnou informaci jako relativní počet imaturních erytrocytů.

### III.3 Koncentrace hemoglobinu

Hlavní funkcí hemoglobinu je přenos dýchacích plynů v organismu. Množství hemoglobinu v periferní krvi udává, jaké množství kyslíku může být přeneseno (nosná kapacita krve) (Glomski & Tamburlin 1989). Nejčastěji používaná metoda zjištění koncentrace hemoglobinu je založena na oxidaci hemoglobinu na methemoglobin a jeho následné přeměně na cyanmethemoglobin. Za tímto účelem je nejčastěji používaným činidlem Drabkinův roztok, který však obsahuje lehce toxické látky hexakynoželezitan draselný a kyanid draselný. Plná krev je ředěna tímto roztokem v poměru 1:251. Tento roztok způsobí lyzi buněk a uvolnění hemoglobinu. Vzorek je následně vyšetřován pomocí spektrofotometru při vlnové délce 540 nm (Drabkin 1949; Campbell & Ellis 2007). Nízká hodnota koncentrace hemoglobinu může být stejně jako nízká hodnota hematokritu a počtu červených krvinek ukazatelem anémie (Velguth et al. 2010). Tato metoda byla použita například ve studiích zabývajících

se vlivem malárie a s ní souvisejícím poklesem koncentrace hemoglobinu v krvi u těhotných žen (Akanbi et al. 2010), negativním vlivem organofosfátových pesticidů na zdraví a hematopoézu ryb (Barbieri & Ferreira 2011) či naopak pozitivním ovlivněním hematopoézy přidáváním mědi jako potravinového doplňku kuřatům (Samanta et al. 2011). Velguth et al. (2010) se zabývali vztahem hodnoty hematokritu a koncentrace hemoglobinu v krvi a došli k závěru, že u minimálně osmi ptačích druhů, na kterých byla tato studie prováděna, lze koncentraci hemoglobinu vyjádřit jako hodnotu hematokritu vynásobenou koeficientem 0,30. Přes takto konzistentní vztah zjištěný v této práci je ovšem potřeba si uvědomit, že platnost tohoto vztahu předpokládá identický zdravotní stav všech vyšetřovaných zvířat. Podobný přepočtení je proto nepoužitelný v případě studií, které se snaží odhalit individuální variabilitu v hodnotách koncentrace hemoglobinu, například v závislosti na zdravotním stavu. Postižená zvířata totiž mohou mít v krvi ve větším množství tzv. hypochromatické erytrocyty se sníženým obsahem hemoglobinu (Campbell & Ellis 2007), což zmiňovaný přepočtení nemůže ošetřit. Přes svůj nezanedbatelný potenciál není stanovování koncentrace hemoglobinu běžně rozšířenou metodou v zoologických studiích.

### **III.4 Absolutní počet erytrocytů, trombocytů a leukocytů**

Pro získání uceleného přehledu o složení krve umožňujícího kvalitní porovnávání hematologických parametrů mezi jedinci je vhodné stanovit celkový počet erytrocytů/leukocytů na jednotku krve. V případě krve savců je dnes stanovení absolutního počtu těchto buněk běžně prováděno přístrojově, tedy tzv. automatickými metodami. Buňky jsou v tomto případě identifikovány na základě rozptylu světla po průchodu laserového paprsku, který je dán vlastnostmi jednotlivých buněk, zejména jejich velikostí a strukturou cytoplasmy (Walberg 2001; Rogival et al. 2006; Chassovnikarova et al. 2005). Při manuálním stanovování absolutního počtu erytrocytů a leukocytů pomocí počítacích komůrek, hemocytometrů, je vzorek krve umístěn do isotonického barvicího roztoku, který jednak zabráni lyzi buněk a zároveň buňky obarví, což umožní jejich následné počítání pod světelným mikroskopem. Leukocyty i erytrocyty většiny obratlovců (mimo savce) obsahují jádro, proto je možné ke stanovení jejich absolutního počtu použít stejné činidlo. V současné době je za tímto účelem ve většině studií používán Natt-Harrickův roztok (Campbell & Ellis 2007; Dein et al. 1994; Walberg 2001; Tociłowski et al. 1997), Unopette metoda (Campbell & Ellis 2007; Dein et al. 1994; Innis et al. 2007; Walberg 2001) a v malém množství případů také Rees-Ecker metoda (Walberg 2001). Při použití manuální metody u savců je nezbytné použít rozdílná činidla. Pro jaderné leukocyty bývá nejčastěji používán Türkův roztok (Pietersz et al. 1992; Sirchia et al. 1996) a pro erytrocyty Hayemův roztok. Postup počítání v hemocytometru je stejný u všech obratlovců a pro oba typy buněk. Naředěný vzorek je napipetován do vnitřního prostoru komůrky o přesně definovaném objemu. Po několika minutách, kdy dojde k usazení buněk na dně komůrky, je možné vzorek vyšetřit pod světelným mikroskopem.

Podstata spočívá ve sčítání buněk na přesně definované ploše (různé počítací komůrky mají různé rozměry mřížky) a známý objem komůrky umožní vypočítání počtu erytrocytů na  $\text{mm}^3$ . Pro stanovení absolutního počtu erytrocytů na  $\text{mm}^3$  krve je nutné toto číslo ještě vynásobit ředicím faktorem.

#### *Absolutní počet erytrocytů*

Kromě studií zabývajících se morfologií krevních elementů a stanovením jejich počtu charakteristického pro daný druh (Gayathri et al. 2004; Gillespie et al. 2000; Tociłowski et al. 1997) nepatří stanovení absolutního počtu erytrocytů mezi často využívané postupy. Nejčastěji bývá používáno spolu se stanovováním hodnoty hematokritu a koncentrace hemoglobinu ve studiích zabývajících se patologiemi, například lyzí erytrocytů vedoucí k anemii, způsobenými infekčními chorobami (Brenden & Huizinga 1986), toxickými látkami (Yamato et al. 1996) či nepřirozenými environmentálními faktory (Valenzuela et al. 2006b). Přesto její časté opomíjení se však jedná o poměrně důležitou metodu, neboť umožňuje například vysvětlení příčin rozdílů v hematokritu nebo validizaci případného odhadu absolutního počtu leukocytů či trombocytů na základě poměru těchto buněčných typů k erytrocytům.

#### *Absolutní počet trombocytů*

Ke stanovení absolutního počtu trombocytů lze použít nepřímou metodu, která však předpokládá znalost absolutního počtu erytrocytů na  $\text{mm}^3$  stanovený pomocí hemocytometrické počítací komůrky (Lucas & Jamroz 1961). Ke stanovení absolutního počtu trombocytů je použit diferenciálně barvený krevní nátěr, který je vyšetřen pod světelným mikroskopem za použití mřížky připevněné na okulár. Tuto mřížku tvoří dva koncentrické čtverce, kde menší čtverec představuje jednu dvacetinu většího. Spočítáním erytrocytů v malém čtverci a trombocytů ve velkém čtverci můžeme zjistit poměr mezi erytrocyty a trombocyty krevního nátěru. Tento poměr odpovídá poměru erytrocytů a trombocytů v plné krvi; známe-li tedy absolutní počet erytrocytů v  $\text{mm}^3$  krve, můžeme jednoduše stanovit i absolutní počet trombocytů v  $\text{mm}^3$  krve (Lucas & Jamroz 1961). Tato metoda je v zoologické praxi velmi málo používána stejně jako ostatní týkající se vyšetření trombocytů, což patrně souvisí s problematickým odběrem, jak bylo nastíněno výše (kapitola II.3).

#### *Absolutní počet leukocytů*

Ke stanovení absolutního počtu leukocytů lze použít několik metod. Přímá metoda podávající výsledky zatížené nejmenší chybou odhadu již byla podrobně popsána výše. Tato metoda představující počítání leukocytů v hemocytometrické komůrce se však vyznačuje časovou náročností a zřejmě proto přistupuje velké množství autorů na nepřímé či polopřímé metody zjištění absolutního počtu leukocytů

v periferní krvi obratlovců. Každá z těchto metod podává výsledky s rozdílnou přesností. Velmi přesné výsledky podává nepřímá metoda stanovení absolutního počtu leukocytů prováděná stejně jako metoda popsaná pro stanovování absolutního počtu trombocytů (Lucas & Jamroz 1961). Jako polopřímou metodu označil Lucas a Jamroz (1961) postup popsany Wisemanem roku 1931. Podle této metody je možné stanovit absolutní počet bílých krvinek na  $\text{mm}^3$  spočítáním eozinem-barvitelných buněk (heterofilů a eozinofilů) v hemocytometrické komůrce a vynásobením této hodnoty procentuálním zastoupením heterofilů a eozinofilů zjištěným při stanovování diferenciálního počtu leukocytů. Velká pravděpodobnost chyby vzniká při nízkém procentuálním zastoupení eozinofilů a heterofilů v periferní krvi (Lucas & Jamroz 1961). Obě tyto metody jsou však srovnatelně časově náročné jako metoda přímá a nepatří tak mezi nejpoužívanější. Namísto toho velké množství autorů stanovuje ve svých studiích absolutní počet leukocytů pomocí krevního nátěru jako počet leukocytů na 10 000 erytrocytů (Dehnhard et al. 2011b; Lobato et al. 2005; Owen & Moore 2006; Butler & McGraw 2010; Fokidis et al. 2008; Horak et al. 1998). Lobato et al (2005) stanovovali celkový počet leukocytů na 10 000 erytrocytů tak, že spočítali erytrocyty v jednom zorném poli světelného mikroskopu pod 1000x zvětšením a tento počet erytrocytů vynásobili počtem zorných polí, která museli prohlédnout při počítání diferenciálního počtu leukocytů pro vyšetření celkového počtu 100 leukocytů. Tímto výpočtem byl získán poměr erytrocytů ku 100 leukocytů, ze kterého bylo možné přepočtem získat počet leukocytů na 10 000 erytrocytů. Tato metoda je problematická vzhledem ke stanovení počtu zorných polí, ve kterých bylo určeno 100 leukocytů při diferenciálním počítání leukocytů, jelikož pohyb objektivu nad sklem je spíše kontinuální a během vyšetřování jediného preparátu může být prohlédnuto několik set až několik tisíc mikroskopických zorných polí. Jakýkoliv odhad jejich přesného počtu je pak vysoce nepřesný a spíše spekulativní. Přesto tuto metodu převzali i autoři dalších studií, například Dehnhard et al. (2011b) a Owen a Moor (2006). Stejným způsobem postupovali také Shutler a Marcogliese (2011), kteří však počet leukocytů vztahovali pouze k 1000 erytrocytům. Výsledek, který tímto postupem získali, pak autoři označují výstižněji jako hustotu bílých krvinek na 1000 erytrocytů (Shutler & Marcogliese 2011). Přesnějších výsledků mohli patrně dosáhnout Galeiotti et al. (2010) ve své studii na ještěrce zední (*Podarcis muralis*), když počítali erytrocyty i leukocyty v 50 mikroskopických zorných polích při zvětšení 630x a tyto počty přepočítali na koncentraci leukocytů ku 10 000 erytrocytům. Zřejmě nejméně přesnou metodu však ve své studii popisují Figuerola et al. (1999), kteří pouze odhadli, že na pěti mikroskopických polích se nachází 1000 erytrocytů. Dále spočítali leukocyty ve 30 polích a toto číslo vydělili šesti, čímž získali průměrný počet leukocytů na pěti polích. Z takto získaných dat spočítali absolutní počet leukocytů na  $\text{mm}^3$  jako průměrný počet leukocytů na pět mikroskopických polí krát  $3,5 \cdot 10^6$  (počet erytrocytů na  $\text{mm}^3$  u normálních ptáků), a to celé děleno 1000 (odhadnutý počet erytrocytů na pět mikroskopických polí). Tyto výsledky museli dále korigovat přes naměřenou hodnotu hematokritu. Nepřesnost této metody spočívá především v předpokladu rovnoměrného rozmístění buněk na krevním nátěru a stejné koncentraci červených krvinek v krvi všech vyšetřovaných



zvířat. Jak bylo zmíněno výše v části zabývající se hematokritem a absolutním počtem erytrocytů, především druhý z předpokladů často neplatí, a tím pádem se daná metoda odhadu absolutního počtu leukocytů stává značně nepřesnou. Jako další možnost stanovení celkového množství leukocytů v krvi může být použita i metoda měření mocnosti tzv. *buffy coat* (Walberg 2001). *Buffy coat* je vrstva bílých krvinek a trombocytů ležící mezi erytrocyty a krevní plazmou po odstředění v heparinizovaných kapilárách (Campbell & Ellis 2007; Lucas & Jamroz 1961). Procento bílých krvinek v objemu plné krve se stanovuje jako hodnota mocnosti *buffy coat* naměřená pomocí zvětšovacího skla a digitálního posuvného měřítka a dělená celkovým objemem krve zjištěným změřením mocnosti krve v kapiláře (Moreno et al. 1998; Cadee 2000). Tato metoda však není příliš rozšířená pro svou nízkou opakovatelnost a tedy i nízkou výpovědní hodnotu (Horak et al. 1998; Ots et al. 1998).

Absolutní počet leukocytů bývá obecně u obratlovců považován za ukazatel zdraví. Vysoký počet bílých krvinek v periferní krvi organismu, tzv. leukocytosa, může být totiž zapříčiněn zejména akutní či chronicky probíhající infekcí (Moreno et al. 1998; Fair et al. 2007a; Ots et al. 1998). Tento stav souvisí nejčastěji s nárůstem prozánětlivých buněk vrozené imunity, kterými jsou především heterofily, resp. neutrofily (Ots et al. 1998). Poměrně velká pozornost byla věnována změnám počtu leukocytů u ptáků během hnízdění a jejich korelaci s reprodukční úspěšností v závislosti na kondici rodičů. Moreno et al. (1998) uvádějí, že dospělci tučňáků uzdičkových (*Pygoscelis antarctica*), kterým se nepodařilo vyvést mladé, měli vyšší absolutní počet leukocytů, zvláště heterofilů a lymfocytů. K podobným výsledkům došla i studie tučňáků magellanských (*Spheniscus magellanicus*), u kterých samice s vyšším počtem leukocytů snášejí menší vejce a mají nižší hnízdní úspěšnost (Moreno et al. 2002). Tento výsledek je v souladu s pozorováním Gustafssona (1994), který ve své studii uvádí, že nutriční stav zvířete před hnízdní sezónou pozitivně koreluje s reprodukčním úspěchem a negativně s náchylností k infekčním chorobám a parazitismu. Měření hematologických parametrů jako je absolutní počet leukocytů spolu s kondičně závislými znaky by tak mohlo sloužit k odhadnutí hnízdní úspěšnosti ptáků bez nutnosti dlouhodobých populačních studií. Je však třeba brát v úvahu, že zvířata trpící podvýživou mívají obecně nižší počet leukocytů, který v těchto případech znamená imunosupresi organismu a vyšší náchylnost k chorobám. Tuto hypotézu potvrzuje studie prováděná na amazonských sladkovodních želvách terekách velkých (*Podocnemis expansa*). U skupiny trpící podvýživou došlo ke snížení absolutního počtu všech druhů leukocytů, kromě eozinofilů, které slabě narostly oproti kontrolní skupině krmené běžnou potravou (Tavares-Dias et al. 2009). Na příkladu těchto studií je možné vidět, že závislost absolutního počtu leukocytů na kondici a kvalitě jedince je obousměrná, tj. vysoký počet leukocytů může být jak znakem jedinců v dobré kondici s dobře fungujícím imunitním systémem, tak jedinců ve špatné kondici, bojujícími s parazitární infekcí (Salvante 2006). Patrně tedy existuje určité optimum početnosti leukocytů v periferní krvi, které je typické pro daný druh, pohlaví, fázi biorytmu a ekologické podmínky. Řada prací ovšem ukazuje, že

i tak se jedná o relativně stabilní znak. Na rozdíl například od hematokritu podléhá absolutní počet leukocytů méně změnám v důsledku stresu. Delehanty & Boonstra (2009) popisují, že ačkoliv počet neutrofilů se u sýslů Richardsonových po odchytu změnil, absolutní počty leukocytů zůstaly stabilní. Změnu v počtu leukocytů nezaznamenali ani Leonardi a Klempau (2003) u pstruha duhového po umělém prodloužení fotoperiody mimo přirozené světelné optimum druhu. Stejně tak nebyla nalezena závislost počtu leukocytů na environmentálních faktorech jako je teplota vody nebo délka slunečního svitu ani u mořčáka evropského (*Dicentrarchus labrax*; Kavadias et al. 2004), ani u plotice obecné (*Rutilus rutilus*; Kortet et al. 2003). V obou těchto studiích (Kavadias et al. 2004; Kortet et al. 2003) však byl prokázán pokles absolutního počtu leukocytů u samců v době tření. Tyto výsledky by mohly naznačovat rozdíly v počtu leukocytů vlivem rozdílné koncentrace pohlavních hormonů u samců a samic. Patrně i zde se však jedná o druhově specifickou závislost, neboť jiné studie vliv pohlaví ani stáří u jiných druhů neprokázaly Boere et al. (2005).

### III.5 Diferenciální počet leukocytů

Stanovení vzájemného poměrového zastoupení všech v krvi rozpoznatelných typů leukocytů bývá v člancích označováno jako diferenciální počet leukocytů (leukocyte diferencial), leukocytární profil (leukocyte profile) či haemogram. Vždy se jedná o stejnou metodu založenou na manuální identifikaci krevních buněk pomocí světelného mikroskopu. K vyšetření se obvykle používají obarvené krevní nátěry, mnohdy předem fixované metanolem. Robertson a Maxwell (1990) ve své studii poukazují na nevhodnost použití metanolu jako fixačního činidla krevních nátěrů ptáků. Působením metanolu dochází totiž k poškození granul heterofilů a bazofilů, což činí správnou identifikaci těchto buněk téměř nemožnou. Přesto je metanol používán k fixaci v mnoha studiích krevních parametrů ptáků, například (Horak et al. 1998; Owen & Moore 2006; Dehnhard et al. 2011b). Existuje několik metodických postupů k barvení krevních nátěrů, přičemž nejčastěji se používá diferenciální barvení podle Pappenheima (v anglosaské literatuře též pod označením Wright-Giemsa; viz např. Lucas & Jamroz 1961; Vinkler et al. 2010b; Schwartz et al. 2004). Tato metoda barvení umožňuje nejen správné rozpoznání jednotlivých buněčných typů, ale i možnost opakovaného vyšetření preparátu pod mikroskopem v případě potřeby. V současnosti jsou dostupná i činidla poskytující rychlé diferenciální barvení krevních nátěrů jako např. Wright-Giemsa modified nebo barvicí kit Diff-Quik (viz. např. Munoz et al. 2010; El Lethey et al. 2000). Na obarveném krevním nátěru je poté vyšetřováno zastoupení jednotlivých typů leukocytů v souboru leukocytů o předem stanoveném počtu pod imerzním objektivem se 100x zvětšením (Davis et al. 2008). Přesnost odhadu se zvyšuje s počtem vyšetřených buněk; stanovení diferenciálního počtu na vzorku 400 buněk představuje dvakrát přesnější výsledek než na vzorku 100 buněk a 900 buněk poskytne třikrát přesnější výsledek než 100 buněk (Lucas & Jamroz 1961). Nejčastěji používaná velikost vzorku je ovšem 100 leukocytů, a to patrně především z časových nároků na vyšetření. Jak

prokázali Lucas a Denington ve svých studiích na kuru domácím (*Gallus gallus* f. *domestica*), 100 buněk stačí pro získání reprezentativních výsledků s ohledem na majoritně zastoupené lymfocyty a heterofily. Pro získání stejně reprezentativního výsledku u monocytů, které nejsou v periferní krvi tak časté jako lymfocyty a heterofily, je za normálního zdravotního stavu zvířat nutné vyšetřit 300 buněk (Lucas & Jamroz 1961). Gross a Siegel (1983) používali místo krevního nátěru ke zjišťování diferenciálního počtu hemocytometrickou počítací komůrku. Největší nevýhodou této metody ovšem je, že vyhodnocení krevního vzorku je potřeba vyhotovit v krátkém časovém intervalu po odběru vzorku, což může být při terénním sběru dat či velkém počtu vzorků problém. Jelikož jsou vzorky v počítací komůrce hodnoceny pod menším zvětšením (max. 40x) a nejsou barveny diferenciálně, další vážnou nevýhodou může být relativně vyšší riziko chybné identifikace buněk. Největší riziko chyby při stanovení diferenciálního počtu leukocytů ovšem vzniká v případě použití nediferenciálního barvení (např. pouze Giemsou; Lobato et al. 2005; Dehnhard et al. 2011b).

Relativní zastoupení jednotlivých typů leukocytů je velmi variabilní mezi jednotlivými obratlovci taxony. U savců jsou například nejpočetněji zastoupeny neutrofily. U ptáků patří mezi nejpočetnější leukocyty u většiny druhů lymfocyty (Davis et al. 2008). Leukocytární poměry se však výrazně liší i na úrovni řádů, čeledí a někdy i jednotlivých druhů (Davis 2011; Vinkler et al. 2010b). Druhově-specifická variabilita v diferenciálním počtu leukocytů by mohla souviset například s nároky organismu v daném evolučně-ekologickém kontextu na imunologickou obranu.

Kromě druhové specifity je ovšem diferenciální počet leukocytů závislý i na momentálním fyziologickém stavu jedince. Nejznámější příčinou změn poměrů leukocytů v periferní krvi je stres. Zvýšením koncentrace stresového hormonu kortikosteronu v těle organismu dochází k řadě událostí, které mohou ovlivnit krátkodobé přežívání jedince. Mezi tyto změny patří jak změny chování, mobilizace energetických rezerv, tak i aktivace imunitního systému. Bylo zjištěno, že působením stresu se může poměrně rychle změnit relativní i absolutní počet lymfocytů a heterofilů (či neutrofilů) v periferní krvi obratlovců (Davis et al. 2008; Maxwell 1993). Studie prováděná Grossem a Sieglem (1983) ukázala, že použití poměru heterofilů a lymfocytů jako indikátoru stresu působícího na organismus je spolehlivější a méně variabilní než použití relativního počtu heterofilů či lymfocytů samostatně (Gross & Siegel 1983; Maxwell 1993). Vlivem zvýšeného kortikosteronu adherují lymfocyty ke stěně cév a transmigrací se dostávají do lymfatických uzlin, sleziny či kůže, což vede ke snížení jejich počtu v krevním oběhu. Zároveň s tím dochází k uvolnění neutrofilů (savci, ryby, obojživelníci), resp. heterofilů (ptáci, plazi) z kostní dřeně, a tím ke zvýšení jejich počtu v periferní krvi (Gross & Siegel 1983; Davis et al. 2008; Dhabhar 2002b; Dhabhar 2002a). Poměr neutrofilů, resp. heterofilů a leukocytů (N/L či H/L) proto odráží fyziologické změny organismu a může tak posloužit k měření stresu působícího na organismus podobně jako měření koncentrace kortikosteronu v krevní



plazmě (Gross & Siegel 1983; Davis et al. 2008). Například u lidí trpících psychickými poruchami jakými jsou deprese či schizofrenie je chronicky zvýšena jak hladina kortikosteronu, tak i poměr N/L (Kronfol et al. 1984). Hladina kortikosteronu v krevní plazmě ovšem vzrůstá během několika málo minut po aplikaci stresového podnětu (Vleck et al. 2000), což může působit problémy při stanovování bazální hladiny kortikosteronu v plazmě (Davis et al. 2008). Tento hormon navíc zůstává v krevní plazmě jen poměrně krátkou dobu (minuty až hodiny) a jeho hladina rychle poklesne po vymizení stresového podnětu (Vleck et al. 2000) nebo se přestane měnit při dlouhodobém vystavení organismu stresu (Maxwell 1993). Mnoho studií proto využívá změnu poměru H/L či N/L jako ukazatel odpovědi na nejružnější stresové podmínky.

Na rozdíl od jiných hematologických parametrů (např. hematokrit Boere et al. 2005; Boonstra et al. 1998; Fletcher & Boonstra 2006; Van Zanten et al. 2004) absolutní počet leukocytů (Davis 2005; Davis et al. 2008) a kortikosteronu, které odrážejí stresovou odpověď krátce po vzniku stresového stavu, se zdá, že poměr H/L neindikuje akutní stres, ale jakousi dlouhodobou stresovou zátěž. Například výsledky pokusů Davise (2005) na hýlovi mexickém (*Carpodacus mexicanus*) ukazují, že hodnoty poměru H/L se nemění v rámci 1 hodiny po manipulaci se zvířetem. Podobně Scope et al. (2002) u holubů domácích (*Columba livia* f. *domestica*) a Van Rijn a Reina (2010) u máčky australské (*Cephaloscyllium laticeps*) ukázali, že vlastní odběr krve a krátkodobá manipulace se zvířaty poměry leukocytů v krvi nemění. Naopak existuje řada prací, které dokládají vliv střednědobě a dlouhodobě působícího stresoru na poměr neutrofilů, resp. heterofilů, a lymfocytů v periferní krvi. Bylo ukázáno, že jako stresující faktory ovlivňující hodnoty H/L mohou působit nejružnější aspekty chovu zvířat a manipulace s nimi. Jako příklad může sloužit studie prováděná na ovcích vystavených transportu dlouhému 12, 30 a 48 hodin (Fisher et al. 2010). Během převozu došlo ke konstantnímu zvýšení N/L bez ohledu na dobu trvání transportu. Nárůst hodnoty poměru N/L odpovídal zvýšené hladině stresových hormonů v krvi zvířat. Po ukončení experimentu však zvířata neprojevovala behaviorální znaky nasvědčující utrpení újmou během transportu a po 72 hodinách došlo i k poklesu hodnot poměru N/L (Fisher et al. 2010). Vliv transportu na dlouhou vzdálenost na zvýšení hodnoty poměru H/L byl prokázán i u dvou druhů dravců běžně používaných v sokolnictví: sokolu stěhovavém (*Falco peregrinus*) a káni Harrisovu (*Parabuteo unicinctus*; Parga et al. 2001). Obdobně působí i změna životních podmínek na divoce žijící ještěrky zední odchycené a umístěné do umělých chovů (Galeotti et al. 2010). Poměr H/L jako ukazatel stresu je možné v některých případech nahradit hodnotou poměru granulocytů a lymfocytů (G/L). To je možné především u organismů, u nichž patří heterofily mezi nejpočetněji zastoupené granulocyty (Hoi-Leitner et al. 2001). Van Rijn a Reina (2010) ukázali, že hodnota poměru G/L může být použita jako spolehlivý indikátor střednědobého stresu u máčky australské. První skupině máček byla krev odebrána ihned po odchytu, druhá skupina byla vystavena působení stresu formou chycení v síti po dobu šesti hodin a poté až podrobena odběru krve. U druhé skupiny došlo k signifikantnímu

nárůstu hodnoty G/L (Van Rijn & Reina 2010). Stejně jako manipulační stres i déle trvající nepříznivé podmínky v chovech zvířat mohou poměry krevních leukocytů významně ovlivnit. Například studie prováděná na kuru domácím ukázala vyšší hladinu H/L, u slepic chovaných bez podestýlky a krmených granulovanou stravou než u slepic chovaných na slaměné podestýlce a krmených kašovitou stravou (El Lethey et al. 2000). To patrně souvisí s celkovou změnou fyziologie stresovaných zvířat. Slepice chované bez podestýlky totiž vykazovaly také zvýšenou míru vytrhávání peří, redukci počtu snášených vajec a nižší koncentraci protilátek v krvi. Mezi další stresové podněty způsobující zvýšení hodnot poměru H/L může patřit i zvýšená hladina hluku, což dokumentují výsledky studií prováděných na mláďatech lejska černohlavého (Tilgar et al. 2010) a rybkách koníčcích vzpřímených (*Hippocampus erectus*) umístěných do nádrže vystavené permanentnímu hluku (Anderson et al. 2011).

Leukocytární poměry v krvi mohou být závislé i na potravním stresu. Dehnhard et al. (2011a) zabývající vlivem strádání během hnízdní sezóny na zdravotní stav samců a samic u tučňáků skalních (*Eudyptes chrysocome*) ukázal, že poměr G/L odráží rozdíly v délce hladovění u samců a samic během hnízdního cyklu. Nejnižší hodnoty poměru G/L během péče o hnízdo byly u obou pohlaví zaznamenány v době, kdy ani jeden z rodičů už nezůstával permanentně u mláděte a místo toho se oba aktivně podíleli na krmení a nebyli tak vystaveni dlouhodobému hladovění (Dehnhard et al. 2011a). K podobným výsledkům dospěli i Hoi-Loiter et al. (2001) v komplexní studii prováděné na mláďatech zvonohlíka zahradního (*Serinus serinus*), kde množství potravních zdrojů ovlivňovalo nejrůznější aspekty imunitní funkce. Mláďata z hnízd na lokalitách s nedostatkem potravy měla vyšší poměr G/L než mláďata v hnízdech s dostatkem potravních zdrojů v okolí. Ačkoliv autoři zjišťovali změnu koncentrace  $\gamma$ -globulinu v krevní plazmě (míra humorální imunitní odpovědi) po injekci ovčích červených krvinek a otokovou reakci patágia po aplikaci fytohemaglutininu (míra buněčné imunitní odpovědi), nebyla vyšetřována změna krevních parametrů po stimulaci imunity těmito antigeny. Z jejich výsledků tedy bohužel nelze vyvozovat žádné závěry o dynamické povaze změn poměrů leukocytů v periferní krvi během aktivace imunitní odpovědi.

Přesto je zřejmé, že aktivace imunitní odpovědi ovlivňuje krevní leukocytární poměry (Norris & Evans 2000). Potvrzují to například práce zabývající se změnami krevního obrazu v důsledku parazitárních chorob. Mladí samci kura bankivského (*Gallus gallus*) infikovaní škrkavkami *Ascaridia galli* měli vyšší procento lymfocytů v rámci leukocytů v periferní krvi než nenakažení samci (Johnsen & Zuk 1998). Naproti tomu u skokana leopardího (*Lithobates pipiens*) byl zaznamenán zvýšený poměr H/L u jedinců nakažených *Hepatozoonem* ssp. oproti jedincům, kteří nakaženi nebyli (Shutler & Marcogliese 2011). Zdá se tedy, že změny hematologických poměrů jsou jednak specifické pro určitý druh parazita a patrně také pro daný druh hostitele. To by potvrzovalo i zjištění, že u příbuzného skokana křiklavého (*Rana clamitans*) nebyl v případě infekce stejným druhem krevního parazita

(*Hepatozoon* ssp.) pozorován žádný rozdíl mezi zvířaty parazitovanými a neparazitovanými (Shutler et al. 2009). Rozdíl v těchto rozdílných výsledcích může ovšem být také způsoben rozdílnou virulencí daného parazita pro oba druhy hostitele či působením dalších stresových podnětů, které nebyly do studie zahrnuty. Paraziti obecně snižují fitness svých hostitelů. Zdá se, že leukocytární krevní poměry by tedy mohly sloužit jako dobrý prediktor individuální fitness. Lobato et al. (2005) ve své studii prováděné na mláďatech lejsků černohlavých prokázali, že mláďata trpící čmelíky (*Dermanyssus gallinoides*) a lehká mláďata trpící podvýživou mají vyšší poměr H/L než zdravá, neparazitovaná mláďata. Mláďata s nízkým poměrem H/L měla ovšem také vyšší návratnost na hnízdiště v dalších letech, což naznačuje jejich lepší přežívání, a tedy i vyšší fitness. Lobato et al. (2005) proto navrhuje využití hodnot poměru H/L jako prediktoru přežívání mláďat u altriciálních ptáků.

Konečně, leukocytární poměry v periferní krvi mohou odrážet také stres související s dlouhodobou fyzickou zátěží. Například Hōrak et al. (1998) zjistili zvýšení poměru H/L u dospělých ptáků sýkory koňadry (*Parus major*) jako odpověď na experimentální zvětšení snůšky. V průběhu pokusu došlo u experimentálních párů k poklesu absolutního počtu leukocytů, což autoři vysvětlili jako imunosupresi odpovídající zvýšenému reprodukčnímu úsilí (Horak et al. 1998). To potvrzují i výsledky Qwena a Moora (Owen & Moore 2006), kteří ukázali, že ptáci mají během jarní migrace, která je obvykle velice intenzivní a fyzicky náročná, vyšší poměr H/L než v době hnízdění či v době podzimní migrace.

Ne každá forma stresu ovšem musí nezbytně vyvolat odezvu v podobě změn H/L. Například výsledky Boonstra et al. (1998) dokládají, že stres způsobený zvýšeným predančním tlakem neměl u zajíce měnivého vliv na změnu hladinu neutrofilů a leukocytů. Podobně ne každá změna v poměru H/L musí být nutně důsledkem obecné stresové odpovědi. Určitá část variability mezi jedinci může být vysvětlena například jako důsledek ontogenetických změn v hematopoéze a vývoji imunitního systému. Například u faetonů červenoocasých (*Phaeton rubricauda westralis*) byly zjištěny rozdíly v poměru H/L mezi mláďaty a dospělými jedinci (Dehnhard et al. 2011b). Vyšší poměr H/L u mláďat je způsobem vyšším počtem heterofilů na 10 000 erytrocytů oproti dospělým jedincům. Naopak počet lymfocytů na 10 000 erytrocytů zůstává stejný u mladých i starších ptáků. Zvýšený počet heterofilů u mláďat vysvětlují autoři vyšší investicí mláďat s vyvíjejícím se imunitním systémem do nespecifických složek imunity, aby tak lépe uchránila svůj organismus před patogeny (Dehnhard et al. 2011b). Jelikož však poměr H/L u mláďat s rostoucím věkem rychle klesal, alternativním vysvětlením může být, že pozorovaný jev vyplývá z diferenciální migrace různých typů leukocytů do tkání v průběhu rané ontogeneze. Zásadním problémem podobných studií ovšem je vlastní metodika práce, která obsahuje závažné chyby. Velká část, ne-li většina ekologicky zaměřených prací využívá chybný protokol přípravy preparátů a jejich vyhodnocení. Jak bylo upozorněno výše, například

fixace krevních nátěrů metanolem snižuje správnost identifikace některých typů granulocytů a nahrazování absolutního počtu leukocytů počtem leukocytů na 10 000 erytrocytů vnáší do dat neuvažovanou variabilitu způsobenou variancí v absolutním počtu erytrocytů. Některé práce se pak dopouštějí ještě výraznějších metodických zjednodušení, která mohou ovlivnit kvalitu získaných výsledků. Například Qwen a Moor (Owen & Moore 2006)) stanovovali diferenciální počet heterofilů a lymfocytů jako počet heterofilů spočítaných na 100 zorných polí ku počtu lymfocytů na 100 zorných polích, což vzhledem ke koncentraci těchto buněk znamená, že celkově byl počítán mnohem menší počet leukocytů než běžně používaných 100, buněk a tedy získaná data nutně vykazují i větší chybu odhadu poměru H/L

## IV Vlastní práce

### IV.1 Úvod

Hematologických metod, které jsou běžně používány v zoologických studiích je jen velice omezený počet. Jak bylo ukázáno v předchozích částech této práce, patří mezi ně především měření hodnoty hematokritu, koncentrace hemoglobinu, stanovování absolutního počtu erytrocytů a lymfocytů a diferenciálního počtu jednotlivých typů leukocytů, z něhož lze určit poměr heterofilů:leukocytům. Krev ovšem poskytuje i další informace, které jsou jen málokdy analyzovány. Například relativní počet imaturních erytrocytů v periferní krvi byl (podle mě dostupných zdrojů) stanovován pouze ve studiích Yamata et al (1996) a Carletona (2008) prováděných na volně žijících zvířatech. Přitom se patrně jedná o metodu s potenciálně zajímavým uplatněním. Imaturní erytrocyty se u druhů s jadernými erytrocyty uvolňují do periferní krve ve větším množství především v souvislosti se zrychlenou hematopoézou, např. po větší ztrátě krve (Campbell & Ellis 2007). Toho by bylo možno využít v zoologickém výzkumu pro stanovení aktuální rychlosti hematopoézy. K podobnému vyšetření lze využít i obyčejný krevní nátěr barvený diferenciálním barvením, který se rutinně připravuje pro stanovení diferenciálního počtu leukocytů. V praktické části své bakalářské práce jsem se proto rozhodla věnovat identifikaci znaků, které jsou s počtem imaturních erytrocytů korelovány. Jako modelový druh jsem si vybrala drobného pěvce hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*).

### IV.2 Metodika

V této studii byl použit vstupní materiál získaný v rámci projektu GAČR 206/06/0851, navrhovatel T. Albrecht. Vyšetřeno bylo padesát jedinců hýla rudého odchycených v letech 2005-2009 ve Vltavském luhu u obce Želna v Národním parku Šumava (podrobnější popis lokality viz Albrecht 2004). Ihned po odchytu byl vyšetřovaným jedincům odebrán vzorek cca 30 µl periferní krve z křídelní žíly, ze kterého byl připraven krevní nátěr. Dále byli všichni ptáci morfometricky změřeni (délka běháku, přesnost 0,01mm; váha, přesnost 0,05g), bylo určeno jejich pohlaví a u samců byla fotograficky standardním způsobem zdokumentována míra ornamentace (viz Albrecht et al. 2009). Poté byli všichni jedinci bezprodleně vypuštěni. Barvení a vyšetření krevních nátěrů probíhalo později v laboratoři. Krevní nátěry byly obarveny diferenciálním barvením podle Pappenheima následujícím způsobem: 1) 3 min. barvení v koncentrovaném činidle May-Grünwald, 2) 2 min. barvení v činidle May-Grünwald ředěném v poměru 1:1 s destilovanou vodou, 3) 15 min. barvení v činidle Giemsa ředěním v poměru 1:40 s destilovanou vodou, 4) omytí nátěru destilovanou vodou a jeho sušení. Diferenciální počet leukocytů byl stanoven M. Vinklerem, který provedl i vyšetření nátěru na přítomnost krevních parazitů rodu *Haemoproteus* (viz Vinkler et al. 2010b). Vyhodnocení digitálních fotografií ornamentů bylo provedeno J. Schnitzerem (viz Albrecht et al. 2009).

Má práce se skládala z vyhotovení digitálních snímků pěti náhodně vybraných míst z každého krevního nátěru pod imerzním objektivem se 100x zvětšením. Na těchto snímcích bylo zachyceno cca 1000-2000 erytrocytů na jedince. Fotografie byly dále softwarově upraveny na černobílý formát v programu Corel PHOTO-PAINT X3. Z takto upravených snímků byl automaticky stanoven celkový počet erytrocytů v programu Image J. V tomtéž programu pak byly na původních snímcích manuálně identifikovány a spočítány všechny imaturní erytrocyty.

Statistické zpracování výsledků provedl T. Albrecht pomocí metody zobecněných lineárních modelů v softwaru R 2.12.1.; model 1,  $n=50$ : vysvětlovaná proměnná: frekvence imaturních erytrocytů; vysvětlující proměnné: pohlaví, standardizovaná hmotnost, poměr heterofilů:lymfocytům v krvi, procento bazofilů v krvi, infekce krevními parazity rodu *Haemoproteus*, interakce pohlaví: velikost, pohlaví: standardizovaná hmotnost, pohlaví:infekce krevními parazity rodu *Haemoproteus*, pohlaví:poměr heterofilů:lymfocytům v krvi a pohlaví: procento bazofilů v krvi, náhodný efekt: rok; model 2 pouze pro dospělé samce,  $n=30$ : vysvětlovaná proměnná: frekvence imaturních erytrocytů; vysvětlující proměnné: délka běháku, standardizovaná hmotnost, procento bazofilů v krvi, barva, sytost, jas, infekce krevními parazity rodu *Haemoproteus*, náhodný efekt: rok.

### IV.3Výsledky a diskuse

Použitá metoda stanovení imaturního počtu erytrocytů byla vysoce opakovatelná (repeatabilita určená na vzorku 10 ex byla  $r=0,93$ ). Výsledky analýzy ukázaly, že relativní zastoupení imaturních erytrocytů v krvi hýla rudého je ve vztahu s relativní hmotností a relativním počtem bazofilů v periferní krvi, a to odlišně u samců a u samic (viz tabulka 1 s minimálním adekvátním modelem). V separátním modelu byla u samic zjištěna negativní korelace mezi procentem imaturních erytrocytů a relativní hmotností ( $DF=15$ ;  $t=-2.715530$ ;  $p=0.0160$ ) (viz Obr 1), zatímco u samců takovýto vztah patrný nebyl. Naopak v separátním modelu u samců byl nalezen signifikantní vztah mezi relativní četností imaturních erytrocytů a frekvencí bazofilů v krvi ( $DF=24$ ;  $t=-3.987307$ ;  $p<0.001$ )(viz Obr 2), který nebyl prokázán u samic. Nebyl nalezen žádný signifikantní vztah imaturních erytrocytů k barvě ornamentace u dospělých samců.

Oproti obdobné studii na hýlovi rudém (Vinkler et al. 2010b) nebyl zjištěn žádný vztah početnosti imaturních erytrocytů k velikosti těla jedince. To může souviset s relativně vysokou heterogenitou vzorku použitého v této práci, která podobný efekt překryla. Naproti tomu vztah k relativní hmotnosti zjištěný u samic by mohl naznačovat vztah s kondicí jedince. Jelikož byl trend tohoto vztahu negativní, lze usuzovat na pomalejší erytropoézu u samic v relativně lepší kondici. Podobně i výsledky získané u samců naznačují, že zdravější samci mají pomalejší krvetvorbu. Bazofily jsou buňkami účastnicími

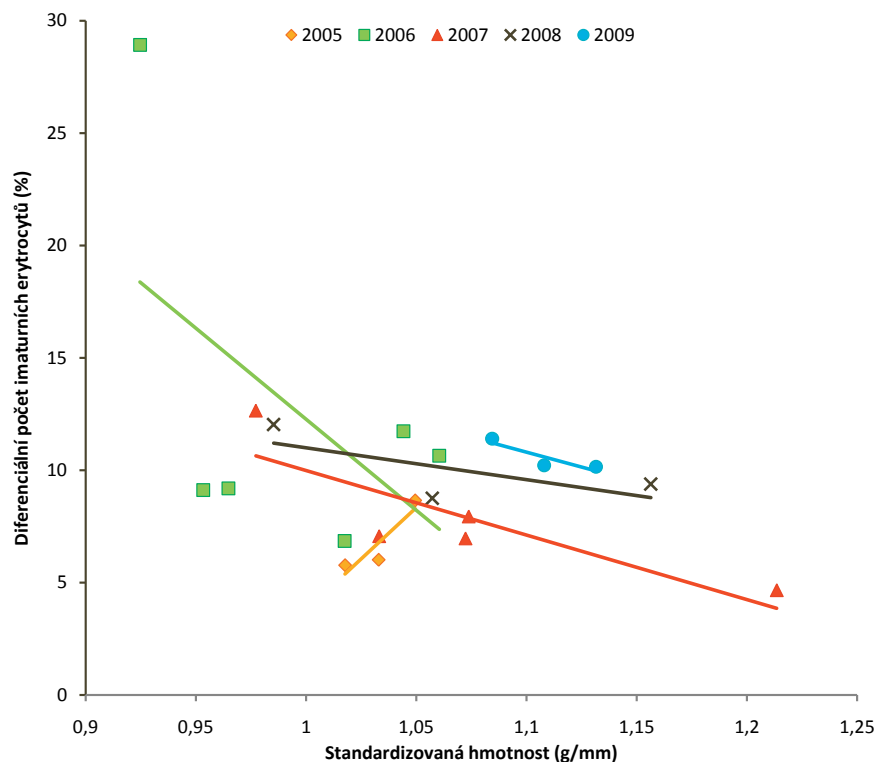


se u ptáků rychlé prozánětlivé odpovědi (Martin et al. 2006; Maxwell & Robertson 1995; Vinkler et al. 2010a). U ptáků se patrně účastní také obrany těla proti krevním parazitům rodu *Haemoproteus* (Garvin et al. 2003). Negativní korelace mezi zastoupením imaturních erytrocytů a frekvencí bazofilů v krvi tedy naznačuje zpomalení krvetvorby u jedinců v horším zdravotním stavu. Přímý vliv ptačí malárie je však nepravděpodobný, neboť její statistická analýza nepotvrdila.

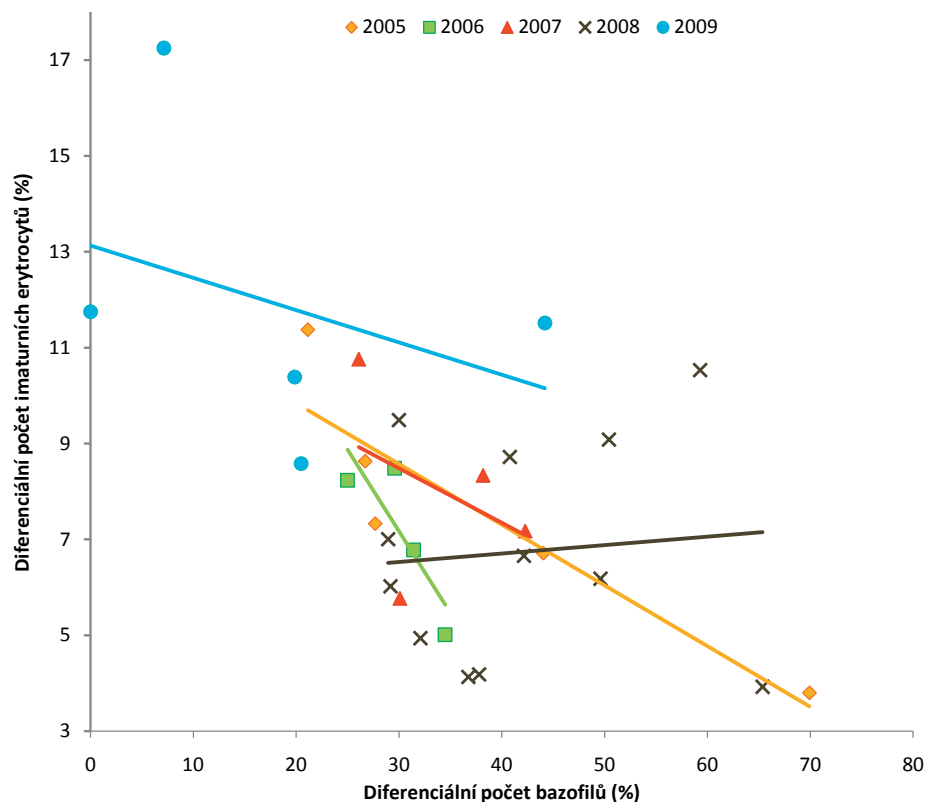
Tabulka 1: Minimální adekvátní model pro vztah mezi diferenciálním počtem imaturních erytrocytů v krvi a kondičně-závislými znaky u hýla rudého.

	směrnice	±	SE	df	t	p
<b>Standardizovaná hmotnost</b>	-3.57	±	0.93	41	-3.85	<0.001
<b>Pohlaví</b>	4.25	±	1.28	41	-3.31	0.002
<b>Dif. počet bazofilů</b>	0.01	±	0.01	41	1.41	0.165
<b>Standardizovaná hmotnost:Pohlaví</b>	4.54	±	1.24	41	3.67	<0.001
<b>Pohlaví:Dif. počet bazofilů</b>	-0.02	±	0.01	41	-2.54	0.015

Obr. 1.: Vztah mezi diferenciálním počtem imaturních erytrocytů a standardizovanou hmotností u samic hýla rudého.



Obr. 2.: Vztah mezi diferenciálním počtem imaturních erytrocytů a diferenciálním počtem bazofilů u samců hýla rudého.



#### IV.4 Závěr

Z výsledků této pilotní studie tedy vyplývá, že vyšetření relativního zastoupení imaturních erytrocytů je potenciálně zajímavé pro posuzování zdravotního stavu a kvality zvířat. Jeho velkou výhodou je relativní technická i finanční nenáročnost, která umožňuje využití této metody v terénním výzkumu. Další výhodou je možnost dodatečného vyhodnocení již nasbíraného materiálu, a to i po několika letech od jeho vyhotovení.



## V Závěr

Hematologické metody diskutované v této práci patří mezi běžně používané postupy v mnoha zoologických odvětvích od živočišné fyziologie a etologie, přes ekologii živočichů a imunologii až po diagnostické aplikace ve veterinární medicíně. Využití většiny těchto metod je relativně finančně nenáročné a mnohdy k němu stačí světelný mikroskop a mikroskopická podložní skla. U některých těchto postupů je nezbytné vyhodnotit odebranou krev v krátkém časovém úseku (hematokrit, absolutní počet krevních buněk stanovovaný pomocí hemocytometru), zatímco jiné umožňují vyhodnocení i po několika letech od vyhotovení preparátu (diferenciální počet leukocytů či imaturních erytrocytů). Některé z těchto metod jsou časově nenáročné (hematokrit) a jiné nejen že jsou časově náročné, ale vyžadují i určitou praxi a zkušenost pro standardizaci výsledků (diferenciální počet leukocytů). Mezi časově nejnáročnější z popisovaných hematologických metod patří patrně manuální stanovování absolutního počtu erytrocytů a leukocytů. Zatímco u některých skupin živočichů (savci) se již podařilo tyto časově náročné techniky nahradit automatickými přístrojovými analýzami, u ostatních skupin to prozatím možné není (většina druhů ptáků, plazů, obojživelníků i ryb).

Výsledky získané hematologickými metodami jsou obvykle dávány do vztahu se zdravím a kondicí vyšetřovaného zvířete. Přes nenáročnost většiny procedur se ovšem mnoho zoologů v hematologii dopouští metodologického i interpretačního zjednodušování, které může vést k nepřesným výsledkům a mylným závěrům. Většina krevních parametrů je ovlivněna velkým počtem proximálních i ultimálních faktorů. Proto, bohužel, výsledky hematologických metod ve většině případů nejsou jednoznačné. Poměry některých krevních elementů se mohou působením nejruznějších stresových podnětů během několika málo minut změnit, stejně jako mohou odrážet nutriční stav zvířete, zvýšenou fyzickou aktivitu či probíhající parazitární infekci. Riziko dezinterpretace získaných výsledků je tedy poměrně vysoké a je potřeba dodatečných informací o celkovém fyziologickém stavu zvířete k tomu, aby mohly být výsledky považovány za směrodatné. V laboratorních podmínkách lze z velké části zamezit vlivu většiny rušivých faktorů, kterým se však nelze vyhnout v případě studií zabývajících se volně žijícími živočichy. V terénním výzkumu je tedy možné výsledky hematologických metod považovat především za pomocné postupy, které sice mohou vést k identifikaci potencionálně významných závislostí, ale které je obvykle nezbytné srovnávat s dalšími například fyziologickými či imunologickými daty.

## VI Poděkování

Na úplný závěr této práce bych ráda poděkovala především svému školiteli Michalu Vinklerovi za čas strávený diskutováním diskutabilních pasáží této práce, podnětné připomínky i množství užitečných doporučení týkající se použité literatury. Velký dík patří i Tomáši Albrechtovi za pomoc se statistickým zpracováním dat a Janu Schnitzerovi za poskytnutí dat týkajících se ornamentace hýla rudého. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Dagmar Vinklerové a svým prarodičům Aleně Kolářové a Karlu Kolářovi za gramatickou korekturu a připomínky ke stylistické úpravě této práce a zbytku své rodiny za všestrannou podporu a péči.

## VII Literatura

- Akanbi OM, Odaibo AB, Olatoregun R, Ademowo AB (2010) Role of malaria induced oxidative stress on anaemia in pregnancy. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3:211-214
- Albrecht T (2004) Edge effect in wetland-arable land boundary determines nesting success of scarlet rosefinches (*Carpodacus erythrinus*) in the Czech Republic. *Auk* 121:361-371
- Albrecht T, Vinkler M, Schnitzer J, Polakova R, Munclinger P, Bryja J (2009) Extra-pair fertilizations contribute to selection on secondary male ornamentation in a socially monogamous passerine. *Journal of Evolutionary Biology* 22:2020-2030
- Altland PD, Brace KC (1962) Red Cell Life Span in Turtle and Toad. *American Journal of Physiology* 203: 1188-&
- Anderson PA, Berzins IK, Fogarty F, Hamlin HJ, Guillette LJ (2011) Sound, stress, and seahorses: The consequences of a noisy environment to animal health. *Aquaculture* 311:129-138
- Barbieri E, Ferreira LAA (2011) Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600 (R) on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 99:209-214
- Bearhop S, Griffiths R, Orr K, Furness RW (1999) Mean corpuscular volume (MCV) as a measure of condition in birds. *Ecology Letters* 2:352-356
- Berger S, Martin LB, Wikelski M, Romero LM, Kalko EKV, Vitousek MN, Rodl T (2005) Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. *Hormones and Behavior* 47:419-429
- Bersenyi A, Fekete SG, Szocs Z, Berta E (2003) Effect of ingested heavy metals (Cd, Pb and Hg) on haematology and serum biochemistry in rabbits. *Acta Veterinaria Hungarica* 51:297-304
- Boere V, Pinheiro EC, Silva IDE, Paludo GR, Canale G, Pianta T, Welker A, Rocha-de-Moura RC (2005) Comparison between sex and age class on some physiological, thermal, and hematological indices of the cerrado's marmoset (*Callithrix penicillata*). *Journal of Medical Primatology* 34:156-162
- Boonstra R, Hik D, Singleton GR, Tinnikov A (1998) The impact of predator-induced stress on the snowshoe hare cycle. *Ecological Monographs* 68:371-394
- Brenden RA, Huizinga HW (1986) Pathophysiology of Experimental *Aeromonas-Hydrophila* Infection in Goldfish, *Carassius-Auratus* (L). *Journal of Fish Diseases* 9:163-167
- Butler MW, McGraw KJ (2010) Relationships between dietary carotenoids, body tissue carotenoids, parasite burden, and health state in wild mallard (*Anas platyrhynchos*) ducklings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 504:154-160
- Cadee N (2000) Parent Barn Swallow fluctuating asymmetry and offspring quality. *Journal of Avian Biology* 31:495-503
- Campbell TW, Ellis CK (2007) Avian and exotic animal hematology and cytology. Blackwell, Ames
- Carleton RE (2008) Ectoparasites affect hemoglobin and percentages of immature erythrocytes but not hematocrit in nestling Eastern Bluebirds. *Wilson Journal of Ornithology* 120:565-568
- Chassovnikarova T, Metcheva R, Dimitrov K (2005) *Microtus guentheri* (Danford & Alston) (Rodentia, Mammalia): a bioindicator species for estimation of the influence of polymetal dust emissions. *Belgian Journal of Zoology* 135:135-137
- Chen KL, Tsay SM, Chiou PWS, Chen TW, Weng BC (2009) Effects of caponization and testosterone implantation on immunity in male chickens. *Poultry Science* 88:1832-1837
- Clark TD, Hinch SG, Taylor BD, Frappell PB, Farrell AP (2009) Sex differences in circulatory oxygen transport parameters of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) on the spawning ground. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 179:663-671
- Claver JA, Quaglia AIE (2009) Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18:87-97

- Constantino BT, Cogionis B (2000) Nucleated RBCs - Significance in the peripheral blood film. *Laboratory Medicine* 31:223-229
- Cross JP, Mackintosh CG, Griffin JFT (1988) Effect of Physical Restraint and Xylazine Sedation on Hematological Values in Red Deer (*Cervus-Elaphus*). *Research in Veterinary Science* 45:281-286
- Davis AK (2005) Effect of handling time and repeated sampling on avian white blood cell counts. *Journal of Field Ornithology* 76:334-338
- Davis AK (2011) The wildlife leukocyte webpage: the ecologist's source for information about leukocytes of wildlife species, [www.wildlifehematology.uga.edu](http://www.wildlifehematology.uga.edu)
- Davis AK, Durso AM (2009) White Blood Cell Differentials of Northern Cricket Frogs (*Acris C. Crepitans*) with A Compilation of Published Values from Other Amphibians. *Herpetologica* 65:260-267
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC (2008) The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22:760-772
- Dawson RD, Bortolotti GR (1997) Are avian hematocrits indicative of condition? American kestrels as a model. *Journal of Wildlife Management* 61:1297-1306
- De Ridder E, Pinxten R, Mees V, Eens M (2002) Short- and long-term effects of male-like concentrations of testosterone on female European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Auk* 119:487-497
- Dehnhard N, Poisbleau M, Demongin L, Quillfeldt P (2011a) Do leucocyte profiles reflect temporal and sexual variation in body condition over the breeding cycle in Southern Rockhopper Penguins? *Journal of Ornithology* 152:759-768
- Dehnhard N, Quillfeldt P, Hennicke JC (2011b) Leucocyte profiles and H/L ratios in chicks of Red-tailed Tropicbirds reflect the ontogeny of the immune system. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 181:641-648
- Dein FJ, Wilson A, Fischer D, Langenberg P (1994) Avian Leukocyte Counting Using the Hemocytometer. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25:432-437
- Delehanty B, Boonstra R (2009) Impact of live trapping on stress profiles of Richardson's ground squirrel (*Spermophilus richardsonii*). *General and Comparative Endocrinology* 160:176-182
- Dhabhar FS (2002a) A hassle a day may keep the doctor away: Stress and the augmentation of immune function. *Integrative and Comparative Biology* 42:556-564
- Dhabhar FS (2002b) Stress-induced augmentation of immune function - The role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behavior and Immunity* 16:785-798
- Drabkin DL (1949) The Standardization of Hemoglobin Measurement. *American Journal of the Medical Sciences* 217:710-711
- Dunlap KD (1995) Hormonal and Behavioral-Responses to Food and Water-Deprivation in A Lizard (*Sceloporus-Occidentalis*) - Implications for Assessing Stress in A Natural-Population. *Journal of Herpetology* 29:345-351
- El Lethy H, Aerni V, Jungi TW, Wechsler B (2000) Stress and feather pecking in laying hens in relation to housing conditions. *British Poultry Science* 41:22-28
- Ewenson EL, Zann RA, Flannery GR (2001) Body condition and immune response in wild zebra finches: effects of capture, confinement and captive-rearing. *Naturwissenschaften* 88:391-394
- Fair J, Whitaker S, Pearson B (2007b) Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis* 149:535-552
- Fair J, Whitaker S, Pearson B (2007a) Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis* 149:535-552
- Fernie KJ, Bird DM (2001) Evidence of oxidative stress in American kestrels exposed to electromagnetic fields. *Environmental Research* 86:198-207
- Figuerola J, Munoz E, Gutierrez R, Ferrer D (1999) Blood parasites, leucocytes and plumage brightness in the Cirl Bunting, *Emberiza cirrus*. *Functional Ecology* 13:594-601

- Fisher AD, Niemeyer DO, Lea JM, Lee C, Paull DR, Reed MT, Ferguson DM (2010) The effects of 12, 30, or 48 hours of road transport on the physiological and behavioral responses of sheep. *Journal of Animal Science* 88:2144-2152
- Fletcher QE, Boonstra R (2006) Impact of live trapping on the stress response of the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*). *Journal of Zoology* 270:473-478
- Fokidis HB, Greiner EC, Deviche P (2008) Interspecific variation in avian blood parasites and haematology associated with urbanization in a desert habitat. *Journal of Avian Biology* 39:300-310
- Galeotti P, Pellitteri-Rosa D, Sacchi R, Gentili A, Pupin F, Rubolini D, Fasola M (2010) Sex-, morph- and size-specific susceptibility to stress measured by haematological variables in captive common wall lizard *Podarcis muralis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 157:354-363
- Gao ZX, Wang WM, Yang Y, Abbas K, Li DP, Zou GW, Diana JS (2007) Morphological studies of peripheral blood cells of the Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis*. *Fish Physiology and Biochemistry* 33:213-222
- Garvin MC, Homer BL, Greiner EC (2003) Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, Kruse, 1890, in blue jays (*Cyanocitta cristata*). *Journal of Wildlife Diseases* 39:161-169
- Gayathri KL, Shenoy KB, Hegde SN (2004) Blood profile of pigeons (*Columba livia*) during growth and breeding. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 138:187-192
- Gillespie D, Frye FL, Stockham SL, Fredeking T (2000) Blood values in wild and captive Komodo dragons (*Varanus komodoensis*). *Zoo Biology* 19:495-509
- Glomski CA, Tamburlin J (1989) The Phylogenetic Odyssey of the Erythrocyte .1. Hemoglobin - the Universal Respiratory Pigment. *Histology and Histopathology* 4:509-514
- Glomski CA, Tamburlin J (1990) The Phylogenetic Odyssey of the Erythrocyte .2. the Early Or Invertebrate Prototypes. *Histology and Histopathology* 5:513-525
- Glomski CA, Tamburlin J, Chainani M (1992) The Phylogenetic Odyssey of the Erythrocyte .3. Fish, the Lower Vertebrate Experience. *Histology and Histopathology* 7:501-528
- Glomski CA, Tamburlin J, Hard R, Chainani M (1997) The phylogenetic odyssey of the erythrocyte .4. The amphibians. *Histology and Histopathology* 12:147-170
- Gross WB, Siegel HS (1983) Evaluation of the Heterophil Lymphocyte Ratio As A Measure of Stress in Chickens. *Avian Diseases* 27:972-979
- Gustafsson L, Nordling D, Andersson MS, Sheldon BC, Qvarnstrom A (1994) Infectious-Diseases, Reproductive Effort and the Cost of Reproduction in Birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 346:323-331
- Hartman FA, Lessler MA (1964) Erythrocyte Measurements in Fishes, Amphibia, and Reptiles. *Biological Bulletin* 126:83-88
- Hiratsuka H, Katsuta O, Toyota N, Tsuchitani M, Umemura T, MArumo F (1996) Chronic cadmium exposure-induced renal anemia in ovariectomized rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137:228-236
- Hoffmayer ER, Parsons GR (2001) The physiological response to capture and handling stress in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Fish Physiology and Biochemistry* 25:277-285
- Hoi-Leitner M, Romero-Pujante M, Hoi H, Pavlova A (2001) Food availability and immune capacity in serin (*Serinus serinus*) nestlings. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49:333-339
- Horak P, Ots I, Murumagi A (1998) Haematological health state indices of reproducing Great Tits: a response to brood size manipulation. *Functional Ecology* 12:750-756
- Innis CJ, Tlustý M, Wunn D (2007) Hematologic and plasma biochemical analysis of juvenile head-started northern red-bellied cooters (*Pseudemys rubriventris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38:425-432

- Johnsen TS, Zuk M (1998) Parasites, morphology, and blood characters in male Red Jungle Fowl during development. *Condor* 100:749-752
- Kavadias S, Castritsi-Catharios J, Dessypris A, Miliou H (2004) Seasonal variation in steroid hormones and blood parameters in cage-farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Applied Ichthyology* 20:58-63
- Kilpimaa J, Alatalo RV, Siitari H (2004) Trade-offs between sexual advertisement and immune function in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:245-250
- Kita J, Itazawa Y (1989) Release of Erythrocytes from the Spleen During Exercise and Splenic Constriction by Adrenaline Infusion in the Rainbow-Trout. *Japanese Journal of Ichthyology* 36:48-52
- Kortet R, Taskinen J, Sinisalo T, Jokinen I (2003) Breeding-related seasonal changes in immunocompetence, health state and condition of the cyprinid fish, *Rutilus rutilus*, L. *Biological Journal of the Linnean Society* 78:117-127
- Kronfol Z, Turner R, Nasrallah H, Winokur G (1984) Leukocyte Regulation in Depression and Schizophrenia. *Psychiatry Research* 13:13-18
- Lam KM (1997) Activation, adhesion, migration and death of chicken thrombocytes. *Comparative Haematology International* 7:81-87
- Lawrence E (2008) *Henderson's Dictionary of Biology*. Pearson Education Limited,
- Leblond PF, Lacelle PL, Weed RI (1971) Cellular Deformability - A Possible Determinant of Normal Release of Maturing Erythrocytes from Bone Marrow. *Blood-the Journal of Hematology* 37:40-&
- Leonardi MO, Klempau AE (2003) Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Aquaculture* 221:581-591
- Lobato E, Moreno J, Merino S, Sanz JJ, Arriero E (2005) Haematological variables are good predictors of recruitment in nestling pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). *Ecoscience* 12:27-34
- Lochmiller RL, Hellgren EC, Varner LW, Grant WE (1986) Serum and Urine Biochemical Indicators of Nutritional-Status in Adult Female Collared Peccaries, *Tayassu-Tajacu* (Tayassuidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* 83:477-488
- Lucas AM, Jamroz BS (1961) *Atlas of avian hematology*. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture, Washington
- Martin LB, Han P, Lewittes J, Kuhlman JR, Klasing KC, Wikelski M (2006) Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. *Functional Ecology* 20: 290-299
- Maxwell MH (1987) The Avian Eosinophil - A Review. *Worlds Poultry Science Journal* 43:190-207
- Maxwell MH (1993) Avian Blood Leukocyte Responses to Stress. *Worlds Poultry Science Journal* 49:34-43
- Maxwell MH, Robertson GW (1995) The avian basophilic leukocyte: A review. *Worlds Poultry Science Journal* 51:307-325
- Maxwell MH, Robertson GW (1998) The avian heterophil leucocyte: a review. *Worlds Poultry Science Journal* 54:155-178
- Moreno J, de Leon A, Fargallo JA, Moreno E (1998) Breeding time, health and immune response in the chinstrap penguin *Pygoscelis antarctica*. *Oecologia* 115:312-319
- Moreno J, Yorio P, Garcia-Borboroglu P, Potti J, Villar S (2002) Health state and reproductive output in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Ethology Ecology & Evolution* 14:19-28
- Morton ML (1994) Hematocrits in Montane Sparrows in Relation to Reproductive Schedule. *Condor* 96:119-126
- Munoz A, Riber C, Trigo P, Castejon F (2010) Hematology and Clinical Pathology Data in Chronically Starved Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 30:581-589



- Norris K, Evans MR (2000) Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behavioral Ecology* 11:19-26
- Ots I, Murumagi A, Horak P (1998) Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation. *Functional Ecology* 12:700-707
- Owen JC, Moore FR (2006) Seasonal differences in immunological condition of three species of thrushes. *Condor* 108:389-398
- Parga ML, Pendl H, Forbes FA (2001) The effect of transport on hematologic parameters in trained and untrained Harris's hawks (*Parabuteo unicinctus*) and peregrine falcons (*Falco peregrinus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery* 15:162-169
- Passantino L, Altamura M, Cianciotta A, Patruno R, Tafaro A, Jirillo E, Passantino GF (2002) Fish immunology. I. Binding and engulfment of *Candida albicans* by erythrocytes of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 24:665-+
- Passantino L, Massaro MA, Jirillo F, Di Modugno D, Ribaud MR, Di Modugno G, Passantino GF, Jirillo E (2007) Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: A conserved phylogenetic function discovered in fish. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 29:141-152
- Peterson CC (2002) Temporal, population, and sexual variation in hematocrit of free-living desert tortoises: correlational tests of causal hypotheses. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 80: 461-470
- Phalen DN, Taylor C, Phalen SW, Bennett GF (1995) Hemograms and Hematozoa of Sharp-Shinned (*Accipiter Striatus*) and Coopers-Hawks (*Accipiter Cooperii*) Captured During Spring Migration in Northern New-York. *Journal of Wildlife Diseases* 31:216-222
- Pietersz RNI, Steneker I, Reesink HW, Dekker WJA, Al EJM, Huisman JG, Biewenga J (1992) Comparison of 5 Different Filters for the Removal of Leukocytes from Red-Cell Concentrates. *Vox Sanguinis* 62:76-81
- Rauff B, Idrees M, Shah SAR, Butt S, Butt AM, Ali L, Hussain A, Irshad uR, Ali M (2011) Hepatitis Associated Aplastic Anemia: A review. *Virology Journal* 8:
- Robertson GW, Maxwell MH (1990) Modified Staining Techniques for Avian Blood-Cells. *British Poultry Science* 31:881-886
- Rogival D, Scheirs J, De Coen W, Verhagen R, Blust R (2006) Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25:149-157
- Saino N, Cuervo JJ, Krivacek M, deLope F, Moller AP (1997a) Experimental manipulation of tail ornament size affects the hematocrit of male barn swallows (*Hirundo rustica*). *Oecologia* 110:186-190
- Saino N, Cuervo JJ, Ninni P, deLope F, Moller AP (1997b) Haematocrit correlates with tail ornament size in three populations of the Barn Swallow (*Hirundo rustica*). *Functional Ecology* 11:604-610
- Salvante KG (2006) Techniques for studying integrated immune function in birds. *Auk* 123:575-586
- Samanta B, Ghosh PR, Biswas A, Das SK (2011) The Effects of Copper Supplementation on the Performance and Hematological Parameters of Broiler Chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 24: 1001-1006
- Sandblom E, Clark TD, Hinch SG, Farrell AP (2009) Sex-specific differences in cardiac control and hematology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) approaching their spawning grounds. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 297:R1136-R1143
- Schwartz JA, Aldridge BM, Lasley BL, Snyder PW, Stott JL, Mohr FC (2004) Chronic fuel oil toxicity in American mink (*Mustela vison*): systemic and hematological effects of ingestion of a low-concentration of bunker C fuel oil. *Toxicology and Applied Pharmacology* 200:146-158
- Scope A, Filip T, Gabler C, Resch F (2002) The influence of stress from transport and handling on hematologic and clinical chemistry blood parameters of racing pigeons (*Columba livia domestica*). *Avian Diseases* 46: 224-229
- Semple JW, Italiano JE, Freedman J (2011) Platelets and the immune continuum. *Nature Reviews Immunology* 11:264-274

- Shutler D, Marcogliese DJ (2011) Leukocyte Profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, Exposed to Pesticides and Hematozoa in Agricultural Wetlands. *Copeia* 301:301-307
- Shutler D, Smith TG, Robinson SR (2009) Relationships Between Leukocytes and Hepatozoon Spp. in Green Frogs, *Rana clamitans*. *Journal of Wildlife Diseases* 45:67-72
- Sills RH, Hadley RAR (1983) The Significance of Nucleated Red-Blood-Cells in the Peripheral-Blood of Children. *American Journal of Pediatric Hematology Oncology* 5:173-177
- Sirchia G, Rebulli P, Sabbioneda L, Garcea F, Greppi N (1996) Optimal conditions for white cell reduction in red cells by filtration at the patient's bedside. *Transfusion* 36:322-327
- St Aubin DJ, Deguise S, Richard PR, Smith TG, Geraci JR (2001) Hematology and plasma chemistry as indicators of health and ecological status in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Arctic* 54:317-331
- Sturkie PD (1986) *Avian physiology*. Springer, New York
- Tavares-Dias M, Oliveira AA, Silva MG, Marcon JL, Barcellos JRM (2009) Comparative hematological and biochemical analysis of giant turtles from the Amazon farmed in poor and normal nutritional conditions. *Veterinarski Arhiv* 79:601-610
- Tilgar V, Saag P, Kulavee R, Mand R (2010) Behavioral and physiological responses of nestling pied flycatchers to acoustic stress. *Hormones and Behavior* 57:481-487
- Tocidlowski ME, Lewbart GA, Stoskopf MK (1997) Hematologic study of red pacu (*Colossoma brachypomum*). *Veterinary Clinical Pathology* 26:119-125
- Trillmich KGK (1983) The Mating System of the Marine Iguana (*Amblyrhynchus-Cristatus*). *Zeitschrift fur Tierpsychologie-Journal of Comparative Ethology* 63:141-172
- Valenzuela AE, Silva VM, Klempau AE (2006a) Effects of constant light on haematological parameters of cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Fish Physiology and Biochemistry* 32:113-120
- Valenzuela AE, Silva VM, Klempau AE (2006b) Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture* 251:596-602
- Van Rijn JA, Reina RD (2010) Distribution of leukocytes as indicators of stress in the Australian swellshark, *Cephaloscyllium laticeps*. *Fish & Shellfish Immunology* 29:534-538
- Van Zanten JJCS, Ring C, Burns VE, Edwards KM, Drayson M, Carroll D (2004) Mental stress-induced hemoconcentration: Sex differences and mechanisms. *Psychophysiology* 41:541-551
- Varma N, Naseem S (2010) Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* 26:78-82
- Velguth KE, Payton ME, Hoover JP (2010) Relationship of Hemoglobin Concentration to Packed Cell Volume in Avian Blood Samples. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 24:115-121
- Vinkler M, Bainova H, Albrecht T (2010a) Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Functional Ecology* 24:1081-1086
- Vinkler M, Schnitzer J, Munclinger P, Votypka J, Albrecht T (2010b) Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood. *Journal of Ornithology* 151: 841-849
- Vleck CM, Vernalino N, Vleck D, Bucher TL (2000) Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie Penguins. *Condor* 102:392-400
- Walberg J (2001) White blood cell counting techniques in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 10: 72-76
- Wigley P, Hulme SD, Barrow PA (1999) Phagocytic and oxidative burst activity of chicken thrombocytes to *Salmonella*, *Escherichia coli* and other bacteria. *Avian Pathology* 28:567-572
- Yamato O, Goto I, Maeda Y (1996) Hemolytic anemia in wild seaducks caused by marine oil pollution. *Journal of Wildlife Diseases* 32:381-384